

FUNKTIONELL GENOMISCHE ASPEKTE DES HÄMSTOFFWECHSELS IN PATIENTEN MIT SCHWERER  
SEPSIS, SEPTISCHEM SCHOCK UND MULTIORGANVERSAGEN

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Anna Viktoria Kern  
geboren am 16.04.1986 in Erfurt**

**Gutachter**

1. .Prof. Dr. med. Michael Bauer, Universitätsklinikum Jena
2. .Prof. Dr. rer. nat. Aria Baniahmad, Universitätsklinikum Jena
3. PD Dr. med. Sebastian Stehr, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein

**Tag der öffentlichen Verteidigung:** 05.01.2016

## Abkürzungsverzeichnis

### Abkürzungsverzeichnis

ACTB	Beta- Aktin
aPC	aktiviertes Protein C
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
BLVRA	Biliverdinreduktase A
BLVRB	Biliverdinreduktase B
CD4	cluster of differentiation 4
cDNA	komplementäre DNA
CO	Kohlenstoffmonoxid
COPRA	Computer Organized Patient Report Assistant
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E	Effizienz der Polymerase-Kettenreaktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Fe <sup>3+</sup>	Eisen(III)-oxid
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomic DNA
H <sub>2</sub> O	Wasser
Hmox 1 -/-	Hämoxygenase knockout
HMOX1	Hämoxygenase-1 Gen
HO-1	Hämoxygenase-1
HO-2	Hämoxygenase-2
HO-3	Hämoxygenase-3
IL-2	Interleukin-2
MLP	microsatellite length polymorphism
MWU	Mann-Whitney-U-Test

## Abkürzungsverzeichnis

NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF- $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qPCR	Real-Time-quantitative-Polymerase-Kettenreaktion
RAGE	Receptor for Advanced Glycation Endproducts
RNA	Ribonukleinsäure
RQI	RNA Quality Index
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
SYBR2	2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)- propylamino]-1-phenyl- 1 <i>H</i> -chinolin-4-ylidenmethyl}- 3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation
Taq-Polymerase	thermostabile DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TH1-Zelle	T-Helferzellen Typ 1
TH2- Zelle	T-Helferzellen Typ 2
TM	Schmelztemperatur
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
UVA	Ultraviolettstrahlung im Wellenlängenbereich von 315 bis 380 nm

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>1</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>4</b>
<b>Summary.....</b>	<b>6</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>8</b>
1.1. Pathomechanismen der Sepsis.....	8
1.2. Hämoxygenase-1 und oxidativer Stress.....	13
1.3. Hämoxygenase-1 und deren Polymorphismen bei verschiedenen Entitäten.....	19
1.4. Sepsis und Hämoxygenase-1.....	21
<b>2. Ziele der Arbeit.....</b>	<b>23</b>
<b>3. Material und Methodik.....</b>	<b>24</b>
3.1. Verwendete Geräte und Software.....	24
3.2. Datenbanken.....	25
3.3. Verwendete Materialien.....	25
3.4. Kohortenbeschreibung.....	26
3.5. Genotypisierung.....	28
3.6. Expressionsanalyse.....	29
3.7. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	34
3.8. Klinische Daten.....	35
3.9. Hemin- und Bilirubinstimulation.....	36
3.10. Statistik.....	37
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>39</b>
4.1 Patientencharakterisierung.....	39
4.2. HMOX1 mRNA Expression im Zeitverlauf.....	44
4.3. HO-1 Proteinkonzentration.....	45
4.4. mRNA-Expression der Biliverdinreduktasen A und B.....	48
4.5. Heminstimulationsdaten.....	50
4.6. Bilirubinstimulation.....	52
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>54</b>
5.1. Charakterisierung der Patientenkohorte mittels SOFA Score.....	54
5.2. Analyse der stressrelevanten Transkripte S100A8 und S100A12.....	55
5.3. HO-1 Proteinexpression in Sepsispatienten.....	57
5.4. Expressionsverhalten der Hämoxygenase-1 unter Einfluss des rs2071746 SNP Genotyps....	59
5.5. Die Bilirubinreduktasen A und B und ihr Produkt Bilirubin.....	60
5.6. Schlussfolgerungen.....	62
<b>6. Anhang.....</b>	<b>64</b>
<b>7. Literatur- und Quellenverzeichnis.....</b>	<b>68</b>

### **Zusammenfassung**

#### **Wissenschaftlicher Hintergrund**

Sepsis ist ein komplexes Krankheitsbild, dessen molekulare Pathogenese unzureichend verstanden ist. Zellulärer Stress ist dabei einer der potentiellen Pathomechanismen. Der näheren Untersuchung explizit des oxidativen Stresses widmet sich diese Arbeit. Dieser gilt als möglicher Mechanismus für das Multiorganversagen, an dem viele Patienten versterben. Die Hämdegradation ist ein wichtiges zellprotektives System. So wirkt ihr Schrittmacherenzym die Hämoxygenase einerseits durch den Abbau des potentiell toxischen Häms, andererseits durch die entstehenden protektiven Produkte wie beispielsweise Bilirubin zellprotektiv. Dabei richtet sich der besondere Fokus auf die stressinduzierte Isoform der Hämoxygenasen, die Hämoxygenase-1.

#### **Fragestellung und Ziele**

Der Stoffwechselweg der Hämdegradation in Patienten mit schwerer Sepsis, septischem Schock und Multiorganversagen sollte im translationalen Ansatz longitudinal von der Hämoxygenase-1 auf genomischer Ebene, Expressionsebene (mRNA) und Proteinebene bis hin zum resultierenden Stoffwechselendprodukt Bilirubin charakterisiert werden. Verschiedene Einflussfaktoren wie der rs2071746 Genotyp und Zielgrößen wie Morbidität und 28 Tage Mortalität sollten betrachtet werden. Außerdem sollten die Biliverdinreduktasen A und B als weiterführende Enzyme sowie die stressrelevanten Transkripte S100A8 und S100A12 auf mRNA Expressionsebene analysiert werden. Zur Schaffung kontrollierter Bedingungen sollten weiterhin Stimulationsexperimente mit Hemin und Bilirubin zur näheren Analyse des Expressionsverhaltens der Hämoxygenase-1 durchgeführt werden.

#### **Methodik**

Hierfür wurden Proben von bis zu 92 Patienten mit schwerer Sepsis, septischem Schock und Multiorganversagen an bis zu 5 Zeitpunkten nach Diagnosestellung analysiert. Als Kontrollgruppe dienten 16 gesunde freiwillige Probanden ähnlicher Alterszusammensetzung.

Verschiedene Parameter zur Patientencharakterisierung wurden betrachtet: der SOFA Score als Schweregradparameter des Organversagens, der Gesamtbilirubingehalt als Endprodukt des Stoffwechselweges und die Intensivstations- beziehungsweise die 28 Tage Mortalität.

Es wurde eine Genotypisierung der Probanden im Hinblick auf den rs2071746 Genotyp

## Zusammenfassung

vorgenommen. Das Expressionsverhalten in zirkulierenden Leukozyten auf mRNA Ebene der Hämoxygenase-1, der Biliverdinreduktasen A und B sowie der stressrelevanten Transkripte S100A8 und S100A12 wurde mit Hilfe der qPCR näher untersucht. Die zirkulierende Proteinmenge der Hämoxygenase-1 wurde mit einem ELISA ausgewertet. Weiterhin wurden ex-vivo Stimulationen mit Bilirubin und Hemin durchgeführt, um unter kontrollierten Bedingungen das Expressionsverhalten der Hämoxygenase-1 zu charakterisieren.

## Ergebnisse und Diskussion

Es konnte eine deutliche Induktion der HO-1 Proteinkonzentration bei den Patienten gegenüber den Kontrollen festgestellt werden. Zu fast allen Zeitpunkten war sogar eine Unterscheidung hinsichtlich Outcome (28 Tagen Überleben versus Versterben) möglich, wobei die später Verstorbenen die höheren Konzentrationen aufwiesen. Auf der mRNA Expressionsebene war hingegen keine Unterscheidung möglich. Auch ein Einfluss des rs2071746 SNP Genotypes konnte nicht nachgewiesen werden. Eine Sensitivität der mRNA Expression der Hämoxygenase-1 durch Stimulation mit Hemin und Bilirubin konnte gezeigt werden. Interessant ist dabei die Betrachtung der umstrittenen Rolle der Hämoxygenase-1 als einerseits in gewissen Expressionsbereichen potentiell zellprotektives, andererseits potentiell schädliches Enzym. So ist die Erhöhung bei den später verstorbenen Patienten einerseits als Hinweis auf einen Zellschaden, andererseits auch als möglicher Beitrag hoher Expression zur Vermittlung von Zellschäden deutbar.

Weiterhin waren die Inflammationsmarker S100A8 und S100A12 bei den Patienten ebenfalls deutlich induziert und ermöglichten zu einigen Zeitpunkten ebenfalls eine Unterscheidung zwischen nach 28 Tagen Überlebenden und Verstorbenen.

## Schlussfolgerungen

Bei der Untersuchung eines konservierten, mit der Stressantwort assoziierten Stoffwechselweges konnte gezeigt werden, dass die Induktion der Hämoxygenase-1 und die Unterscheidbarkeit zwischen später verstorbenen und überlebenden Patienten einen neuen Aspekt zur potentiellen Risikostratifizierung von Sepsispatienten und damit Therapieoptimierung darstellt.

Auch die Betrachtung der Inflammationsmarker S100A8 und S100A12 in zirkulierenden Leukozyten stellt im Hinblick auf Ihre Rolle im Krankheitsbild Sepsis einen näher zu analysierenden Ansatz dar.

### **Summary**

#### **Background**

Sepsis is a complex disease whose pathogenesis is still not completely understood. One of the principal pathomechanisms is cellular stress. The main focus of this thesis is on the role of oxidative stress. This is thought to reflect a key mechanism of multi organ failure, which is a leading cause of death of septic patients. An important cytoprotective system is heme degradation. The pacemaker enzyme hemoxygenase is held to be cell protective: on the one hand by the degradation of potentially toxic heme and on the other hand by producing protective products such as bilirubin. Here, especially the stress-induced isoform hemoxygenase-1 stands in the spotlight.

#### **Tasks and aims**

The metabolic pathway of the heme degradation in patients with severe sepsis, septic shock and multi organ failure should be characterized within a translational approach longitudinally starting with the hemoxygenase-1 at the genomic, expression (mRNA) and protein levels to the point of the resulting metabolic end product bilirubin. Different influencing factors like the rs2071746 genotype and endpoints like morbidity and 28days mortality should be examined. Moreover the resulting enzymes biliverdinreductases A and B and the stressrelevant transcripts S100A8 and S100A12 shall be analysed at mRNA expression levels. To maintain controlled conditions for the closer analysis of the hemoxygenase-1 expression stimulation experiments with hemin and bilirubin should be performed.

#### **Methods**

Samples of up to 92 patients with severe sepsis, septic shock and multi organ failure at up to 5 timepoints after diagnosis were analysed. The control group consisted of 16 age-matched healthy volunteers.

Different parameters for the characterization of the patients were enrolled: the SOFA score as a parameter for the organ failure severity, the total bilirubin level as an end-product of the metabolic pathways and the intensive care unit and 28 days mortality.

Furthermore the probands have been genotyped regarding the rs2071746genotype. The mRNA expression of hemoxygenase-1, biliverdinreductases A and B and the stress-relevant transcripts



## Summary

S100A8 and S100A12 of the circulating leucocytes were examined via qPCR. The circulating protein level of the hemeoxygenase-1 was investigated by an ELISA. Moreover ex-vivo stimulation experiments with bilirubin and hemin were conducted to characterize the expression level of hemeoxygenase-1 under controlled conditions.

## Results and discussion

A significant induction of the HO-1 protein level in patients compared to controls could be determined. At nearly all timepoints even a differentiation concerning outcome (28days survival versus death) could be found. Patients with unfavourable outcome had the higher protein concentrations. At mRNA expression level no differentiation was possible. Moreover an influence of the rs2071746 SNP genotype could not be observed. A sensitivity of the hemeoxygenase-1 mRNA expression to a stimulation by hemin and bilirubin could be shown. Of special interest in this context is the controversially discussed role of the hemeoxygenase-1 as on one hand in certain expression levels potentially cell protective and on the other hand potentially toxic enzyme. Hence the higher protein levels in the later deceased patients could be interpreted as a an indicator for cellular damage or a potential attempt for damage control.

Moreover the inflammation markers S100A8 and S100A12 were also significantly increased and at some timepoints a differentiation concerning 28days outcome could be made.

## Conclusions

Examination of a highly conserved, stress response-associated metabolic pathway demonstrated, that the induction of the hemeoxygenase-1 and the differentiation with respect to outcome which could be used for potential risk assessment and therefore therapy optimization of septic patients. Furthermore the proper characterization of the inflammation markers S100A8 and S100A12 in circulating leucocytes concerning their role in sepsis is worth for a closer evaluation.

## 1. Einleitung

### **1. Einleitung**

„Sepsis ist definiert als komplexe systemische inflammatorische Wirtsreaktion auf eine Infektion.“ Diese Definition findet sich in den Leitlinien der deutschen Sepsisgesellschaft e.V. 2010.

Doch schon diese Definition und die damit verbundenen Einschlusskriterien von Sepsisstudien sind durchaus umstritten. So bringt beispielsweise der hohe prozentuale Anteil von kultur-negativen Sepsiserkrankten und die damit teils subjektive Zuteilung zum Krankheitsbild und Einschlusskriterium Sepsis einen großen Interpretationsspielraum der einzelnen Untersucher mit sich (Angus 2011).

Die grundlegenden Pathomechanismen der Sepsis sind ebenfalls noch nicht abschließend geklärt und Grundlage für vielfältige Forschungsansätze. Daher folgt zunächst eine kurze Einführung in einige der aktuell postulierten Hypothesen zur Pathogenese des noch immer nicht vollständig verstandenen Krankheitsbildes Sepsis.

#### **1.1. Pathomechanismen der Sepsis**

Bis Anfang des einundzwanzigsten Jahrhunderts wurde angenommen, dass die Sepsis eine Überreaktion des Immunsystems des Körpers auf eine Infektion ist. Dieser Annahme lagen allerdings vor allem tierexperimentelle Studien zugrunde (Hotchkiss und Karl 2003). Viele der daraufhin begonnenen Studien, die eine Unterdrückung der Inflammation als möglichen Therapieansatz zum Ziel hatten, führten nicht zum gewünschten Erfolg (Bone et al. 1987, Bernard et al. 1997, Opal et al. 2013). Beispielsweise wurde mit dem Einsatz von Antizytokinen zur Unterdrückung der Entzündungsreaktion experimentiert. Diese Versuche zeigten ein großes Ergebnisspektrum mit teils völlig gegensätzliche Wirkungen (Ziegler et al. 1991, Fisher et al. 1996, Fisher et al. 1994, Abraham et al. 1995). Sowohl eine Verbesserung als auch eine Verschlechterung der Mortalitätsrate konnten beobachtet werden. So wurde herausgefunden, dass für bestimmte Untergruppen, beispielsweise für Patienten mit Meningokokkämie, das Postulat einer Überreaktion des Immunsystems durchaus zutrifft, während andere Sepsisursachen allerdings ein deutlich komplexeres Bild der Immunreaktion bieten (Girardin et al. 1988, Debets et al. 1989, Røyg et al. 1994, Hatherill et al. 2000, Oberholzer et al. 2000).

## 1. Einleitung

Dies scheint umso plausibler, wenn die mannigfaltigen Möglichkeiten des Körpers auf Infektionen zu reagieren, in die Betrachtung miteinbezogen werden. Um ein Beispiel zu nennen, seien die unterschiedlichen Reaktionsmöglichkeiten der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, als kleine Subpopulation im Gesamtspiel der Immunprozesse, genannt: Die Aufnahme von nekrotischen Zellen durch Makrophagen und dendritische Zellen und die darauf folgende Freisetzung von unter anderem Interleukin-2 (IL-2) triggert eine TH1 gewichtete pro-inflammatorische Antwort. Die Aufnahme von apoptotischen Zellen hingegen kann zweierlei Funktionszustände des Immunsystems auslösen: einerseits die TH2 gewichtete Antwort mit der Freisetzung von anti-inflammatorischen Zellen, andererseits die „Anergie“ der T-Zellen, d.h. eine Nichtreagibilität auf Antigene (Abbas et al. 1996, Hotchkiss und Karl 2003, Hotchkiss et al. 2003, Voll et al. 1997, Barker et al. 1999). Schon anhand der Variationsbreite einer Zellsubpopulation wird die Komplexität der Antwort des Gesamtorganismus mit seinen mannigfaltigen Einflussfaktoren sichtbar.

In der Sepsis scheinen so verschiedene Immunlagen wie Überreagibilität und Suppression des Immunsystems eine Rolle zu spielen (Hotchkiss und Karl 2003).

Im scheinbaren Gegensatz zu der zunächst angenommenen These der Sepsis als Überreaktion des Organismus wurde so festgestellt, dass sich viele Todesfälle interessanterweise während des hypoimmunen Zustandes der Patienten ereignen (Hotchkiss und Karl 2003). Dieser hypoimmune Zustand ist durch einen Abfall des Levels der B-Zellen, der CD4<sup>+</sup> T-Zellen und der dendritischen Zellen gekennzeichnet (Hotchkiss et al. 2002, Hotchkiss et al. 2001). Auch hier ist allerdings eine klare Einteilung der Sepsis in Stadien verschiedener Immunlagen umstritten. Vielmehr wird von einem Nebeneinander pro- und antiinflammatorischer Antworten ausgegangen (Hotchkiss et al. 2013). Einige Therapiestudien mit verschiedenen immunadaptierten Zielstrategien führten zu der Annahme, dass gewisse Therapieansätze in Untergruppen von Patienten mit spezifischer Immunlage erfolgversprechend sind. Einer genauen Charakterisierung des Immunstatus des Patienten kommt somit eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Therapiestrategien zu (Hotchkiss und Karl 2003, Boomer et al. 2011).

Die exakten Ursachen, welche zum Tode der Sepsispatienten führen, sind jedoch noch immer nicht abschließend geklärt (Hotchkiss und Karl 2003, Hotchkiss et al. 2013). Häufig scheint ein Organversagen, welches über ein sich entwickelndes Multiorganversagen zum Tode führt, ein möglicher Mechanismus zu sein. Wie genau sich dieses Multiorganversagen allerdings entwickelt,

## 1. Einleitung

bleibt weiterhin ein spannender Forschungsgegenstand.

### 1.1.1. Organversagen als Pathomechanismus der Sepsis

Organversagen führt, wie bereits erwähnt, häufig zum Tode von Sepsispatienten. Um neue Therapiestrategien gegen Sepsis zu entwickeln und deren potentielle Ansatzpunkte nachvollziehen zu können, scheint es daher unabdingbar zu verstehen, durch welche Faktoren das Organversagen ausgelöst und beeinflusst werden kann. Aus dem komplexen Spiel der verschiedenen Faktoren soll kurz exemplarisch auf die Beeinflussung des Gerinnungssystems sowie die Versorgung der Gewebe während einer Sepsis eingegangen werden.

Während der Sepsis wird eine **prokoagulatorische Tendenz des Gerinnungssystem** beobachtet. Es kommt zum Beispiel zu verringerten Konzentrationen des aktivierten Protein C (aPC). Das aktivierte Protein C besitzt eine antikoagulatorische Funktion. In Patienten mit Sepsis konnten verminderte aPC Spiegel, sowie eine eingeschränkte Expression des endothelialen Thrombomodulins und des endothelialen Protein-C-Rezeptors nachgewiesen werden (Faust et al. 2001a, Faust et al. 2001b, Cohen 2002). Weiterhin konnte ein gesteigerter Fibrinspiegel nachgewiesen werden (Cohen 2002). All diese Veränderungen wirken prokoagulatorisch.

Somit kann bei Patienten mit Sepsis von einem prokoagulatorischen Zustand des Gerinnungssystems ausgegangen werden. Dies ist ein erster möglicher Grund für die vorliegenden **Mikrozirkulationsstörungen** während einer Sepsis. Diese Mikrozirkulationsstörungen scheinen wiederum eine wichtige Rolle während des Organversagens bei Sepsiserkrankten zu spielen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Mikrozirkulationsstörungen ist die sogenannte **disseminierte intravasale Gerinnung**. Diese wird definiert als systemisches Syndrom, das durch eine gesteigerte Koagulationsaktivität mit intravaskulärer Fibrinbildung und -ablagerung abhängig vom Aktivitätsgrad gekennzeichnet ist (Ten Cate et al. 2001).

Zunächst kommt es bei der disseminierten intravasalen Gerinnung durch die systemische Aktivierung von Zytokinen zu einer inflammatorischen Antwort. Es wird vermehrt Thrombin gebildet und die Fibrinolyse herunterreguliert. Danach werden intravaskuläre Fibrinformationen gebildet und Endothelzellen aktiviert. Dies führt zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität, welche als Hinweis auf die Schädigung der Endothelzellen gewertet werden kann. Dadurch wird

## 1. Einleitung

die Entzündungsreaktion weiter verschärft und eine Gewebeschädigung tritt auf. Außerdem lagert sich intra- und extravaskulär Fibrin ab (dies ist insbesondere beim Akuten Respiratorischem Distress Syndrom (ARDS) belegt). Die Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten nehmen ab. Dies wiederum kann zu Blutungen führen (Ten Cate et al. 2001). Durch diese Mechanismen kommt es zur zunehmenden Einschränkung der Mikrozirkulation und damit im weiteren Verlauf zur Begünstigung der Entwicklung eines Organversagens.

Durch die Störung der Mikrozirkulation kommt es außerdem zur **Hypoxie** (Ten Cate et al. 2001). Hypoxie assoziierte Transkriptionsfaktoren werden induziert. Dies hat eine sogenannte ischämische Präkonditionierung zur Folge, welcher wiederum ein protektiver Effekt auf die jeweiligen Organe zugeschrieben wird (Semenza 2000).

Die Störung der Mikrozirkulation bei Patienten mit Sepsis stellt somit einerseits, wie weiter oben beschrieben, einen potentiellen Beitrag zur Organschädigung und damit zu einem Multiorganversagen dar, andererseits interessanterweise einen möglicherweise protektiven Effekt. Verschiedene Faktoren spielen bei der Entstehung einer **Minderperfusion** und damit Hypoxie von Geweben eine Rolle.

Beispielsweise trägt die Bildung von Gewebsexsudaten zur Abnahme der Oxygenierung von Geweben bei (Cohen 2002).

Einfluss hat auch die Abnahme der myokardialen Kontraktilität, die zur Abnahme der Gewebssperfusion führt. Ein Mechanismus ist dabei die Freisetzung von Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ ), welche über die Induktion der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS) eine gesteigerte vaskuläre Instabilität und eine direkte myokardiale Depression bewirkt (Landry und Oliver 2001, Cohen 2002). Durch die gesteigerte NO-Freisetzung kommt es auch zur Hemmung der mitochondrialen Zellatmung und damit verbunden zu einer Einschränkung des Energiestoffwechsels (Brealey et al. 2002). Außerdem findet man sogenannte dysoxische Zellen, welche trotz verfügbarem Sauerstoff außer Stande sind, diesen adäquat zu nutzen (Brealey et al. 2002). Durch die vermehrte Ansammlung von Neutrophilen kommt es zudem zur Freisetzung lysosomaler Enzyme und von Superoxidionen gebildeter freier Radikale, die potentiell zelltoxisch wirken. Die Summe dieser Mechanismen tragen somit zur zunehmenden Gewebsschädigung und damit zum Organversagen bei (Cohen 2002).

## 1. Einleitung

Die Bedeutung des Organversagens im Rahmen der Sepsis ist allerdings nicht unumstritten. So wird ebenfalls die These einer potentiell **protektiven Rolle des Organversagens** vertreten (Abraham und Singer 2007, Singer et al. 2004). Histologisch lassen sich bei Nichtüberlebenden der Sepsis teilweise keine oder nur geringe Schädigungen der Organe nachweisen (Hotchkiss et al. 1999). Dies führt zur Annahme, dass das Multiorganversagen eher als funktionelle statt als strukturelle Abnormalität zu begreifen ist (Singer et al. 2004). Weiter wird postuliert, dass durch die starke Entzündungsreaktion und sekundäre Änderungen im Hormonspiegel eine Abnahme der mitochondrialen Energieproduktion, des metabolischen Umsatzes sowie normaler Zellprozesse erfolgt (Singer et al. 2004). Dies führt dann zum Multiorganversagen. Vor allem dem Einfluss auf die mitochondriale Atmungskette - dem Hauptort der Adenosintriphosphat (ATP) Produktion und Energiegewinnung des Körpers - kommt in diesem Modell besondere Bedeutung zu. NO und reaktiven Sauerstoffspezies (Brealey et al. 2002), Zytokinen sowie der Abnahme stimulatorischer Hormone (wie Glukokortikoiden und Schilddrüsenhormonen) und der Reduzierung des positiven Feedbackmechanismus durch metabolische Nachfrage werden hemmende Effekte auf die mitochondrialen Atmungsenzyme zugeschrieben (Singer et al. 2004). Diese Abnahme der Energieproduktion und damit des Zellmetabolismus führt zur Abnahme der Organfunktion. Dieser Prozess wird als „Winterschlaf“ der Organe aufgefasst, der eine adaptive und potentiell protektive Antwort auf eine überwältigende systemische Entzündung darstellt (Singer et al. 2004, Abraham und Singer 2007).

Die Pathogenese der Sepsis ist somit ein durchaus kontrovers diskutierter Gegenstand der aktuellen Forschung und ermutigt zu weiteren Untersuchungen.

Wie kurz dargestellt, gibt es verschiedene Ansätze, die in der Erforschung der Pathogenese der Sepsis eine Rolle spielen. Von immunologischen Phänomenen über Aspekte des Gerinnungssystems, der Minderversorgung der Gewebe bis hin zur Auswirkung verschiedener Stressfaktoren werden die unterschiedlichsten Einflüsse untersucht. In der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus auf dem Einfluss des Faktors Stress, speziell des oxidativen Stresses auf das Krankheitsbild Sepsis.

## 1. Einleitung

### 1.2. Hämoxygenase-1 und oxidativer Stress

Oxidativer Stress liegt dabei definitionsgemäß vor, wenn das Gleichgewicht zwischen prooxidativen und antioxidativen Kräften zugunsten der prooxidativen verschoben ist (Florczyk et al. 2008).

Wie bereits im Abschnitt 1.1.1. ausgeführt, wird den reaktiven Sauerstoffspezies und dem damit einhergehenden oxidativen Stress während der Sepsis eine wichtige Rolle zugeschrieben. So werden dadurch potentiell Organe geschädigt und in ihrer Funktion beeinträchtigt.

Die Hämoxygenase als potentes antioxidatives Enzym und geschwindigkeitsbestimmendes Enzym im Rahmen des physiologisch zellprotektiven Prozesses der Hämdegradation rückt somit konsequenterweise in den Blickpunkt der Betrachtung.

Die Hämoxygenase-1 ist die u.a. durch Stress induzierbare Form der Hämoxygenasen (Braggins et al. 1986, Maines et al. 1986). Eine besondere Bedeutung kommt der Hämoxygenase-1 bei der Antwort auf systemischen Stress und in der Zellprotektion zu.

Durch die Funktion der Hämoxygenase in der Hämdegradation wird das prooxidative Häm abgebaut, und Bilirubin und Kohlenstoffmonoxid werden gebildet (Tenhunen et al. 1969). Dies wirkt in der Summe antioxidativ und somit protektiv gegen oxidativen Stress. Den beiden Reaktionsprodukten Bilirubin und Kohlenstoffmonoxid wird, wie weiter unten näher erläutert, eine wichtige Rolle in der Zellprotektion zugeschrieben. Das ebenfalls entstehende prooxidative Eisen wird sofort von Transferrin und Ferritin gebunden und dadurch die Bildung von freien Radikalen eingeschränkt (Abraham und Kappas 2008). Die Hämoxygenase-1 wirkt somit antioxidativ und bildet einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt bei der Eindämmung des potentiell gewebeschädigenden oxidativen Stresses (Scott et al. 2007). Um diesen Ansatzpunkt besser zu verstehen, folgt nun ein kurzer Exkurs zu den Funktionen der Hämoxygenase.

Die **Hämoxygenase** ist ein ubiquitäres Enzym, welches in der mikrosomalen Fraktion zu finden ist (Tenhunen et al. 1969). Die Expression wird in verschiedenen Geweben, die in Tabelle 1 aufgelistet sind, beschrieben (Exner et al. 2004).

## 1. Einleitung

**Tab.1 Gewebsspezifische Expression der Hämoxxygenase**

Endothelzellen
Gehirn
glatte Gefäßmuskelzellen
Herz
Intestinum
Leber
Lunge
Milz
Niere
Pankreas
Prostata
Retina
Rückenmark

Beim Menschen liegt die Hämoxxygenase in zwei Isoformen vor (HO-1 und HO-2). Das Vorliegen einer dritten Isoform (HO-3) wurde in der Ratte postuliert. Die Hämoxxygenase-3 weist allerdings eine hohe Homologie von 90 Prozent zur Hämoxxygenase-2 auf. Zudem konnten die Ergebnisse des Vorliegens einer dritten Isoform in der Ratte beim Menschen nicht bestätigt werden. Schließlich stellte sich heraus, dass die Hämoxxygenase-3 ein Pseudogen der Hämoxxygenase-2 ist (McCoubrey et al. 1995, Maines 2004, Hayashi et al. 2004).

Als konstitutiv exprimiertes Isoenzym wird der Hämoxxygenase-2 beispielsweise eine Rolle bei der neuronalen Protektion zugeschrieben (Jansen et al. 2010).

Die Hämoxxygenase-1 hingegen ist durch Stress induzierbar (Maines 2004). Dabei wird sie von verschiedensten Stimuli induziert (siehe Tab. 2 (Schober et al. 2006)).

**Tab.2 Induktoren der Hämoxxygenase-1**

Bakterielle Endotoxine
Häm
Hyperoxie
Hypoxie
Stickstoffmonoxid
UV-A Licht
Wachstumsfaktoren
Wasserstoffperoxid
Zytokine

Das Enzym Hämoxxygenase katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im **Hämabbau** (Tenhunen et al. 1968). Durch die Spaltung des Mesocarbonringes in Anwesenheit von 3mol



## 1. Einleitung

Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat ( $\text{NADPH} + \text{H}^+$ ) und 3 mol Sauerstoff wird Häm in äquimolare Mengen Biliverdin IX $\alpha$ , molekulares Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) und Kohlenstoffmonoxid sowie 3 mol Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat ( $\text{NADP}^+$ ) und 3 mol Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) umgesetzt (Tenhunen et al. 1969).

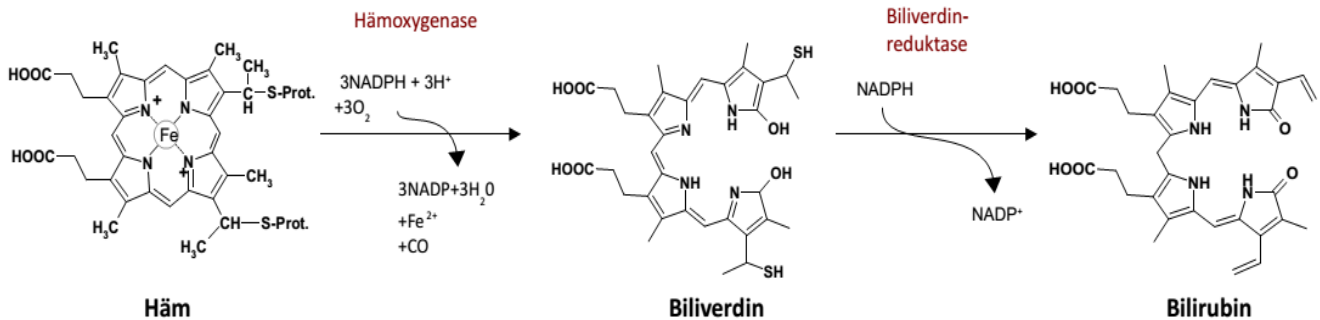


Abb.1 Hämdegradation

Das Edukt **Häm** ist ein Komplex aus Protoporphyrin IX und Eisen. Häufig kommt Häm als prosthetische Gruppe vor, so z.B. bei Hämoglobin, Myoglobin und Zytochromen. Beim Absterben der Erythrozyten und dem damit verbundenen Freiwerden von Hämoglobin entstehen große Mengen freies Häm. Dieses wird aufgrund seiner potentiellen Toxizität jedoch in seiner Konzentration streng reguliert (Ponka 1999). Besonders die Hämdegradation und hierbei die Hämoxigenase spielen bei dieser Regulation eine wichtige Rolle.

Den Produkten des Hämabbaus (Tab.3) werden dabei verschiedenste Eigenschaften zugeschrieben.

Tab.3 Produkte der Hämdegradation
Eisen ( $\text{Fe}^{3+}$ )
Biliverdin → Bilirubin
Kohlenstoffmonoxid (CO)

Das entstehende **Eisen** wird an endogenes Transferrin gebunden, damit detoxifiziert und abtransportiert. Durch Häm erfolgt hierbei einerseits die Induktion der Hämoxigenase und andererseits eine Hochregulation des intrazellulären Eisenbindungsproteins Ferritin. Die Induktion von Ferritin wird durch das entstehende freie Eisen nochmals verstärkt, was die detoxifizierende Wirkung dieses Stoffwechselweges unterstreicht. Die potentiell toxischen Eigenschaften von

## 1. Einleitung

freiem Eisen werden somit effizient limitiert (Balla et al. 2005). Eine erhöhte Hämoxxygenase-1-Aktivität geht mit einer verminderten Aufnahme und einer erhöhten Abgabe von Eisen durch die Zellen einher. Dabei wird die Induktion einer mikrosomalen eisentransportierenden ATPase als zugrundeliegender Mechanismus angenommen. Die verminderte Eisenlast der Zellen durch die gesteigerte Hämoxxygenaseaktivität stellt dabei eine protektive Funktion dar (Ferris et al. 1999). Weiterhin ist Eisen ein wichtiger Nährstoff für potentiell pathogene Mikroorganismen (Ward et al. 2011). Einer effektiven Limitierung dieses Wachstumsfaktors kommt somit im Rahmen der Sepsis eine besondere Bedeutung zu.

**Biliverdin**, das weitere Stoffwechselprodukt der Hämoxxygenase, wird umgehend durch die Biliverdinreduktase zu Bilirubin umgesetzt (Tenhunen et al. 1970). Da Bilirubin ein etwa dreifach höheres antioxidatives Potential als Biliverdin besitzt, ist auch diese Reaktion von hoher zytoprotektiver Bedeutung (Jansen et al. 2010).

Weiterhin wird folgender Redoxkreislauf postuliert: die Reoxidierung von Bilirubin zu Biliverdin und die darauffolgende Umwandlung von Biliverdin zurück in Bilirubin durch die Biliverdinreduktase. Dieser Redoxkreislauf weist ein hohes Redoxpotential auf. Er ist somit als ein weiterer wichtiger Mechanismus der Zelle gegen oxidativen Stress zu werten (Florczyk et al. 2008, Soares und Bach 2009, Baranano et al. 2002).

Das so entstandene **Bilirubin** weist verschiedene potentiell zytoprotektive Effekte auf.

Es wirkt vasodilatatorisch und hemmt die Adhäsion von Neutrophilen an Endothelzellen bei Ischämie und in Reperfusions-Modellen (Ishikawa et al. 1997, Shibahara et al. 2002). Bilirubin wirkt somit präventiv gegen oxidativen Stress. Weiterhin ist seine direkte und indirekte antioxidatorische Wirkung beschrieben. Bilirubin gilt daher als wichtiges physiologisches Antioxidans (Stocker et al. 1987). Weiterhin wird eine Induktion der Hämoxxygenase-1 durch das Endprodukt Bilirubin angenommen. Das unterlegt so ebenfalls die wichtige zytoprotektive Bedeutung von Bilirubin (Jansen et al. 2010). Im Zusammenhang mit dem Krankheitsbild Sepsis nimmt Bilirubin, einerseits durch seine routinemäßige Bestimmung auf Intensivstation im Rahmen der funktionellen Leberdiagnostik und andererseits als Teil des sogenannten SOFA (Sequential Organ Failure Assessment), welches zur Messung des Schweregrades des Organversagens herangezogen wird,

## 1. Einleitung

eine besondere klinische Relevanz ein (Minne et al. 2008).

Das ebenfalls aus der Hämdegradation entstehende **Kohlenstoffmonoxid** bildet mit circa 85 Prozent den größten Anteil des endogen gebildeten Kohlenstoffmonoxids (Abraham und Kappas 2008, Takaki et al. 2010). Es inhibiert die Plättchenaggregation und wirkt antisklerotisch, antiapoptotisch und proangiogenetisch (Abraham und Kappas 2008, Jansen et al. 2010).

Der Hämoxygenase-1 und ihren Produkten kann in der Zusammenschau somit eine wichtige zytoprotektive Funktion attestiert werden. Daher wurde die Hämoxygenase-1 schon in einigen **Forschungsansätzen** unter anderem zu ihrer **Bedeutung bei oxidativem Stress** hin genauer untersucht. Um einen kurzen Überblick zu erhalten, wird nun ein Abriss der bisherigen Ergebnisse von der Zellebene, über tierexperimentelle Ansätze bis hin zur Obduktion der ersten bekannten Hämoxygenase-1 defizienten Patienten gegeben.

Auf **Zellkulturebene** konnte eine Induktion der Hämoxygenase-1 als Reaktion auf oxidativen Stress bei humanen Fibroblastenzellen nachgewiesen werden. Die Induktion der Hämoxygenase durch vorhergehende leichtere Stimuli (dort: UVA) ist dabei von besonderer Bedeutung. Damit geht eine protektive Funktion der induzierten Hämoxygenase bei der späteren eigentlichen Exposition mit Stressfaktoren einher (Vile et al. 1994).

Dies weist auf einen präventiven Effekt der Hämoxygenase-1 bei oxidativem Stress hin.

Im **Tiermodell** konnte dieser protektive Effekt bei  $Hmox1^{-/-}$  embryonalen Fibroblasten der Maus nochmals bestätigt werden. Als stärkster Induktor der Hämoxygenase gilt Hemin (Bharucha et al. 2010, Otterbein und Choi 2000). Nach Heminexposition wiesen die  $Hmox1^{-/-}$  embryonalen Fibroblasten eine erhöhte Konzentration an freien Radikalen im Vergleich zu Kontrollmäusen auf. Die Bildung von freien Radikalen scheint so durch die Hämoxygenase-1 eingeschränkt zu werden. Weiterhin wurde bei  $Hmox1^{-/-}$  Mäusen nach Endotoxinexposition eine erhöhte Mortalität im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt (Poss und Tonegawa 1997). Dies unterlegt abermals die protektive Funktion der Hämoxygenase-1.

Ebenfalls wurde eine erhöhte Rate an letalen ischämischen Lungenverletzungen bei  $Hmox1^{-/-}$

## 1. Einleitung

Mäusen gefunden. Durch die Inhalation von geringen Konzentrationen Kohlenstoffmonoxid konnte diese allerdings erfolgreich behandelt werden (Fujita et al. 2001).

Damit wurde auch im Tiermodell die wichtige protektive Funktion der Hämoxigenase-1 und ihrer Produkte bestätigt.

Ein weiterer Einblick in die Bedeutung der Hämoxigenase-1 in der Pathophysiologie des oxidativen Stresses wurde durch die Diagnose und spätere Obduktion des ersten bekannten Hämoxigenase-1 defizienten **Patienten** möglich. Dieser 6 Jahre alte Junge wies die in Tabelle 4 aufgeführten pathologisch-anatomischen Diagnosen auf. Im Gegensatz zu den Hmox1<sup>-/-</sup> Mäusen war eine eingeschränkte Lebenserwartung durch intravaskuläre Hämolyse, disseminierte intravaskuläre Koagulation und Amyloidose zu verzeichnen (Yachie et al. 1999, Kawashima et al. 2002). Ein weiterer Fall von Hämoxigenase-1 Defizienz wurde bei einem 15jährigen Mädchen mit angeborener Asplenie beschrieben. Diese Patientin litt ebenfalls an schwerer therapierefraktärer Hämolyse, Entzündung und Nephritis und verstarb ebenfalls (Radhakrishnan et al. 2011). Die Seltenheit dieser Diagnose unterstreicht die physiologische Bedeutung der Hämoxigenase-1 für den Menschen. Bemerkenswerterweise sind einige dieser Charakteristika (Tab.4) auch bei Sepsispatienten häufig zu finden und legen somit eine Analyse der Hämoxigenase-1 bei Patienten mit Sepsis nahe.

Tab.4 Pathologisch- anatomische Diagnosen

Amyloidose
Anämie
erhöhte Serumkonzentrationen an Haptoglobin, Häm, Ferritin
geringe Bilirubinserumkonzentration
Gerinnungsstörungen (disseminierte intravaskuläre Koagulation)
Hyperlipidämie
intravaskuläre Hämolyse
Leukozytose
systemische Endothelverletzungen
Thrombozytose
Wachstumsretardierung

Zusammenfassend weisen all diese Forschungsergebnisse auf verschiedenen Ebenen deutlich auf eine wichtige protektive Funktion der Hämoxigenase-1 insbesondere bei oxidativem Stress hin.

Bei der näheren Erforschung der Hämoxigenase-1 wurden auf genomischer Ebene beim

## 1. Einleitung

Menschen einige Polymorphismen, die auch funktionelle Bedeutung haben, gefunden. Diese wurden auf ihren Einfluss auf den Verlauf verschiedener Krankheitsbilder hin analysiert.

### 1.3. Hämoxygenase-1 und deren Polymorphismen bei verschiedenen Entitäten

Zunächst einmal liegen beide Isoformen der Hämoxygenase auf verschiedenen Chromosomen. Während die Hämoxygenase-1 auf Chromosom 22q12 lokalisiert wurde, liegt die Hämoxygenase-2 auf Chromosom 16p13.3. Dies spricht abermals für verschiedene Funktionen und eine unterschiedliche Regulation der beiden Isoenzyme (Kutty et al. 1994).

Die Hämoxygenase-1, als die bei oxidativem Stress induzierbare Form, wurde in verschiedenen Studien auf ihren Einfluss auf verschiedenen Krankheitsentitäten hin untersucht (Exner et al. 2004). Dabei konnten bei der Hämoxygenase-1 verschiedene funktionell bedeutsame genetische Polymorphismen festgestellt werden. Insbesondere der Effekt eines GT-Dinukleotid Repeats (rs3074372) und des A(-413)T Single Nukleotid Polymorphismus (SNP, rs2071746) stießen dabei auf Interesse. Diesen konnte ein Einfluss auf die Aktivität der Promotorregion und damit die Expression der Hämoxygenase-1 nachgewiesen werden. Beide vorher genannten Polymorphismen scheinen im sogenannten Linkage Disequilibrium zu stehen. Dabei bezeichnet das Linkage Disequilibrium eine Assoziation zwischen verschiedenen SNPs. Wobei durch das Wissen des Genotypes eines SNPs der Genotyp des anderen vorausgesagt werden kann (Crawford und Nickerson 2005). Weiterhin wird eine Dominanz des A(-413)T SNP gegenüber dem GT-Dinukleotid postuliert (Buis et al. 2008).

Um die klinische Relevanz dieses Ansatzes zu verdeutlichen, folgen nun exemplarisch einige Krankheitsentitäten und der Einfluss verschiedener Polymorphismen der Hämoxygenase auf diese.

Es wurden einige Studien zum großen Komplex der **kardiovaskulären Krankheiten** durchgeführt. So war beispielsweise die Inzidenz von ischämischen Herzerkrankungen beim AA Genotyp des A(-413)T SNP vermindert. Dies wurde auf eine höhere Expression der Hämoxygenase-1 bei diesem Genotyp zurückgeführt. Für denselben Genotyp wird allerdings auch eine erhöhte Rate an Bluthochdruckerkrankungen bei Frauen beschrieben (Ono et al. 2004, Ono et al. 2003). Die Ergebnisse hinsichtlich der Auswirkungen des AA-Genotypes sind also durchaus widersprüchlich.

Bei Patienten mit einem GT-Dinukleotid Repeat unter 27 wurde ein vermindertes Risiko für

## 1. Einleitung

koronare Herzerkrankungen bei den Risikofaktoren Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie oder Rauchen festgestellt (Kaneda et al. 2002). Bei Koronarstentapplikationen war ein GT-Dinukelotid Repeat über 26 ebenfalls mit einem höheren Restenose Risiko assoziiert (Chen et al. 2004).

Bei arterieller Ballondilatation konnte außerdem ein geringeres Entzündungslevel bei GT-Dinukleotid Repeats unter 25 festgestellt werden (Schillinger et al. 2002). Eine geringere GT-Dinukletikanzahl scheint also eine positive Auswirkung auf einige kardiovaskuläre Krankheitsbilder zu besitzen. Einschränkend muss hierbei die unterschiedliche Längeneinteilung der GT-Nukleotide sowie das Überwiegen asiatischer Populationen in den Studien berücksichtigt werden.

Beim Akuten Respiratorischen Disstress Syndrom (**ARDS**) hingegen ist eine Assoziation von langen GT-Dinukleotid Repeats mit einem verringertem Erkrankungsrisiko beschrieben (Sheu et al. 2009).

Auch auf dem Gebiet der **Transplantationsforschung** existieren einige Studien zur Bedeutung der Polymorphismen der Hämoxygenase.

Bei Nierentransplantation beispielsweise führt eine Gabe von Dopamin an den Organspender zu einem erhöhten Langzeitüberleben der Organe beim Empfänger. In kultivierten Endothelzellen konnte hierbei eine Induktion der Hämoxygenase-1 auf RNA- und Proteinebene nach Dopamingabe festgestellt werden. Die Induktion dieses protektiven Enzyms wird für das erhöhte Langzeitüberleben verantwortlich gemacht (Berger et al. 2000).

Eine Induktion der Hämoxygenase-1 scheint auch bei Herztransplantaten bei der Ratte einen protektiven Effekt gegenüber Ischämien zu bewirken (Katori et al. 2002).

Eine Assoziation zwischen höherem Transplantatüberleben und dem Auftreten des AA-Genotypes bei Lebertransplantationen konnte ermittelt werden. Dabei wird diese protektive Funktion mit einer gesteigerten HMOX-1 mRNA-Expression in der Leber bei diesem Genotyp in Verbindung gebracht (Buis et al. 2008).

Der Einfluss der oben genannten Polymorphismen wurde so bei verschiedenen Krankheitsentitäten beschrieben. Vor allem in den neueren Publikationen ab 2005 konnte eine zunehmende Fokussierung auf den A(-413) T Single Nukleotid Polymorphismus festgestellt werden.

Die Ergebnisse der verschiedenen Studien sind allerdings teils widersprüchlich und unterscheiden

## 1. Einleitung

sich in den Studienpopulationen. Die Fähigkeit der Patienten, abhängig vom Genotyp, die HO-1 Synthese hochzuregulieren, scheint ein wichtiger endogener Schutzmechanismus zu sein (Exner et al. 2004). Die nähere Untersuchung dieser Polymorphismen in Patienten mit Sepsis bezogen auf deren Mortalität ist somit ein interessanter Ansatzpunkt um die endogenen Schutzmechanismen, die bei der Sepsis eine Rolle spielen, genauer zu beleuchten.

### 1.4. Sepsis und Hämoxygenase-1

Warum die Untersuchung der Hämoxygenase-1 bei Patienten mit Sepsis besonders interessant ist, wurde nun in den vorhergehenden Abschnitten von verschiedenen Ansatzpunkten heraus näher erklärt. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf der Induktion von systemischem Stress durch eine Sepsis. Bei systemischem Stress kommt es bekannterweise zu einer Induktion der Hämoxygenase-1 in allen Geweben, außer Gehirn und Hoden (Maines 2004). U.a. durch Aktivierung der Neutrophilen und den damit einhergehenden „respiratory burst“ während einer Sepsis wird oxidativer Stress ausgelöst, dem somit eine besondere Bedeutung zukommt.

Im Tiermodell kann dies beispielsweise anhand der Endotoxinstimulation, die als Modell für ein Sepsis-ähnliches Syndrom gilt, veranschaulicht werden. So wurde bei Schweinen durch eine Endotoxinstimulation ein Organversagen ausgelöst und damit einhergehend eine erhöhte Mortalität beobachtet. Dies wird auf die Bildung von freien Radikalen und somit auf oxidativen Stress zurückgeführt (Basu und Eriksson 1998).

Die Hämoxygenase-1 spielt, wie in Abschnitt 1.2. beschrieben, eine besondere Bedeutung bei der Antwort des Körpers auf oxidativen Stress. So kommt es bei Hmox1<sup>-/-</sup> Mäusen nach Endotoxingabe zum Endorganschaden infolge von erhöhtem oxidativen Stress (Wiesel et al. 2000).

Verschiedene Mechanismen führen dabei zu einer protektiven Funktion der Hämoxygenase-1 bei einer Sepsis.

Beispielsweise spielen **immunomodulatorische Effekte** eine Rolle. So wurde eine Verschiebung zur TH1- gewichteten Antwort der Zytokine bei Hmox1<sup>-/-</sup> Mäusen beobachtet. Diese geht mit einer proinflammatorischen Tendenz einher (Kapturczak et al. 2004). Ebenfalls senkt die Hämoxygenase-1 durch Modulation von Immunfunktionen wie der T-Helferzellfunktion das Risiko von Endothelschäden (Exner et al. 2004).

## 1. Einleitung

Aktivierte Neutrophile verursachen Leberschäden bei Endotoxinämie (Jaeschke und Smith 1997). Außerdem sind sie an den Organschäden nach Sepsis beteiligt. Bilirubin als Produkt der Hämoxygenase-1 reduziert die Adhäsion von Neutrophilen an die Endothelzellen und damit indirekt das Risiko für Organschäden (Ishikawa et al. 1997, Shibahara et al. 2002).

Die Hämoxygenase-1 scheint somit eine wichtige protektive Funktion in Hinsicht auf die Modifikation von verschiedenen Zellpopulationen des Immunsystems zu besitzen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt sind die **antioxidativen Eigenschaften** der Endprodukte des Hämabbaus Kohlenstoffmonoxid und Bilirubin.

Besonders Kohlenstoffmonoxid rückt dabei konsequenterweise klinisch in den Fokus, da es in der Ausatemluft bei Patienten mit Sepsis noninvasiv gemessen werden kann. Kohlenstoffmonoxid wird endogen zu circa 85 Prozent durch die Hämoxygenase-1 produziert, daher gilt es als Parameter für die in-vivo Aktivität der Hämoxygenase-1. In einer Studie war die Kohlenstoffmonoxidkonzentration in der Ausatemluft in Patienten mit Sepsis in den ersten drei Tagen gegenüber Patienten ohne Sepsis erhöht. Am ersten Tag war ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen später überlebenden und verstorbenen Sepsispatienten festzustellen. Dabei wiesen die Überlebenden deutlich höhere Kohlenstoffmonoxidkonzentrationen auf (Zegdi et al. 2002). In einer anderen Studie konnte eine Erhöhung der arteriellen Kohlenstoffmonoxidkonzentration, Zytokinkonzentration, Bilirubinkonzentration und monozytärer HO-1 Proteinexpression bei Patienten mit Sepsis im Gegensatz zu Patienten ohne Sepsis festgestellt werden. Eine positive Korrelation zwischen Überleben der Sepsispatienten und einer erhöhten HO-1 Proteinexpression sowie erhöhten arteriellen CO-Konzentrationen wurde nachgewiesen (Takaki et al. 2010). Die Hämoxygenase-1 scheint beim Krankheitsbild Sepsis also eine potentiell bedeutsame protektive Funktion zu spielen.

Diese Rolle funktionell genomisch näher zu charakterisieren, ist das Anliegen der vorliegenden Arbeit.



## 2. Ziele der Arbeit

### **2. Ziele der Arbeit**

Dem Krankheitsbild Sepsis liegen verschiedene Mechanismen zugrunde, deren jeweiliger Einfluss noch immer nicht abschließend geklärt ist. So spielt auch der oxidative Stress eine wichtige Rolle bei der Keimabwehr und der Entwicklung des Organversagens. Ein bedeutender physiologischer zellprotektiver Prozess ist andererseits die Hämdegradation, die insbesondere während einer Sepsis gesteigert ist. Das Schrittmacherenzym des Hämabbaus, die Hämoxigenase und explizit ihre unter anderem durch Stress induzierbare Form der Hämoxigenase-1, liegt somit konsequenterweise im Fokus der Betrachtung der Zellprotektion beim Organversagen. Durch die antioxidativen und zellprotektiven Eigenschaften ihrer Produkte erscheint die Hämoxigenase somit als ein besonders interessanter Ansatzpunkt, um ihren Einfluss auf das Organversagen näher zu analysieren. Daher wird die Hämdegradation auf verschiedenen Ebenen untersucht. Vom Einfluss verschiedener genetischer Polymorphismen (SNPs) über die Expressionsebene (mRNA) bis hin zur Proteinebene wird eine Charakterisierung im longitudinalen Verlauf einer Sepsis vorgenommen. Durch weiterführende Stimulationsexperimente wurden mögliche Einflussfaktoren auf eine Induktion der Hämoxigenase-1 näher untersucht. Natürlich werden auch die Produkte des Hämabbaues am Beispiel des Bilirubins beleuchtet. Dies scheint vor dem Hintergrund der Verwendung von Bilirubin als Parameter im sogenannten SOFA-Score, der ein etabliertes Scoringssystem auf Intensivstationen bei Patienten mit Sepsis und Organversagen darstellt, als logische Konsequenz. Der Analyse dieser möglicherweise neuen Verlaufsparmter der Sepsis, wird dabei die Charakterisierung der Kohorte mit bereits beschriebenen Prognoseparametern (SOFA, S100A8 und S100A12) gegenübergestellt, um so das tatsächliche Potential des Ansatzes realistisch abschätzen zu können.

### 3. Material und Methodik

#### **3. Material und Methodik**

##### **3.1. Verwendete Geräte und Software**

###### **3.1.1. Geräte**

Nanodrop ND 1000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc.
QIAcube	Qiagen GmbH
Experion Automated Electrophoresis Station	Bio-Rad Laboratories Inc.
Experion Priming Station	Bio-Rad Laboratories Inc.
Experion Vortex Station II	Bio-Rad Laboratories Inc.
CAS-1200™	Corbett Robotics Inc.
Rotor-Gene Q	Qiagen GmbH
Vortex Genie2	Scientific Industries
Eppendorf Centrifuge 5415D, 5402, 5824R	Eppendorf AG
Biofuge stratos	Heraeus instruments GmbH
Optima™ TLX Ultracentrifuge 120000RPM	Beckman Coulter Inc.
Bandelin Sonopuls UW2200	Bandelin electronics GmbH
Microplate Washer HydroFlex™	Tecan Group Ltd
Molecular devices Thermomax microplate reader	MWG-Biotech mbH
Schüttelwasserbad GFL1083	GFL mbH
Feinwaage BP 61	Sartorius AG
MJ Research PTC-200 Thermo Cycler	MJResearch Inc.
Labor-pH-Meter InoLab pH Level 2	WTW GmbH & Co. KG
Magnetrührer mit Heizung MR 3001	Heidolph Instruments GmbH

###### **3.1.2. Software**

PASW Statistics 18 und 19  
SigmaPlot 11.0  
OpenOffice.org Writer 3.2.1/3.4.1  
OpenOffice.org Calc 3.2.1/3.4.1  
LibreOffice 4.2.6.3

### 3. Material und Methodik

Mendeley Desktop 0.9.8.2/1.9.2

Nanodrop 3.7.0

Experion Software

BioEdit v7.0.5

EndNote X6

#### 3.2. Datenbanken

<http://www.ensembl.org>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/./UniGene/>

<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

#### 3.3. Verwendete Materialien

##### 3.3.1. Probenkonservierung

S-Monovetten: Kalium EDTA Vollblut (2,7ml), Lithium-Heparin Plasma (9ml), Serum-Gel (9ml),

Citratplasma (3ml)

Sarstedt

PAXgene™ Blood RNA Tube

PreAnalytiX GmbH

##### 3.3.2 . Kits

RNA Isolation

PAXgene Blood RNA Kit

PreAnalytiX GmbH

Elektrophorese

Experion™ RNA StdSens Analysis Kit

Biorad Laboratories

cDNA Synthese

RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit

Fermentas

PCR Produkte Aufreinigung

MinElute PCR Purification Kit

Qiagen

quantitative PCR

Brilliant SYBR® Green QPCR Master Mix

Stratagene

ELISA

Human HO-1 ELISA Kit

Assay Designs Inc.

##### 3.3.3. Chemikalien

Ethanol unvergällt 96% p.A.

SERVA Electrophoresis GmbH

Trichlormethan

Carl Roth GmbH& Co. KG

### 3. Material und Methodik

β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Sigma-Aldrich
Hemin	Sigma-Aldrich
D-Glucose-6-phosphat-Dinatriumsalz-Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glucose-6-phosphate Dehydrogenase	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glycerin 86%	Carl Roth GmbH & Co. KG
1,4- Dithiothreitol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ethylendiamin-tetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG
TRIS	Carl Roth GmbH & Co. KG
TRIS-hydrochlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG
PMSF	AppliChem GmbH
Bilirubin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co. KG
RNAse free water	Pre Analytix

#### 3.4. Kohortenbeschreibung

Im Rahmen der Studie wurden 50 Patienten eingeschlossen (nähere Charakterisierung siehe Tab.5).

Folgende Einschlusskriterien wurden analog zur VISEP Studie festgelegt (Brunkhorst et al. 2008):

- schwere Sepsis oder septischer Schock
- Alter  $\geq$  18 Jahre
- Symptome entwickelten sich weniger als 24 Stunden vor Einweisung auf Intensivstation
- Symptome entwickelten sich weniger als 12 Stunden nach Überweisung auf Intensivstation

Der Definition der schweren Sepsis und des septischen Schocks wurden die Leitlinien der deutschen Sepsisgesellschaft e.V. von 2010 zugrunde gelegt (siehe Anhang).

Die Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena genehmigte die Sammlung der Proben

### 3. Material und Methodik

und deren Auswertung unter der Bearbeitungsnummer 2160-11/07. Die Blutabnahmen und die anschließende Herstellung des Serums sowie Citratplasmas wurde durch die Studienschwestern der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin durchgeführt (Abnahmeprotokoll siehe Tab.6). Die Patienten, beziehungsweise deren rechtliche Vertreter, wurden über die Studienziele aufgeklärt. Einverständniserklärungen liegen von allen Patienten vor.

Die Kontrollgruppe bestand aus 16 Freiwilligen mit ähnlicher Alterszusammensetzung (siehe Tab.5). Auch sie wurden über die Zielsetzung der Studie und die geplanten Analysen aufgeklärt. Von allen Personen liegen Einverständniserklärungen vor. Die Aufklärung sowie die Blutentnahmen wurden durch Dr. med. C. Sponholz durchgeführt (Abnahmeprotokoll siehe Tab. 6). Die Herstellung des Plasmas wurde analog zu den Protokollen der Studienschwestern für Anästhesiologie und Intensivmedizin durchgeführt.

Die an den jeweiligen Probenarten durchgeführten Analysen sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tab. 5 **Charakterisierung der Patienten und der Kontrollgruppe**

	Patienten (n=50)		Kontrollen (n=16)
	Überlebende* (n= 38)	Verstorbene* (n=12)	
<b>Alter</b> (in Jahren)**	62,88 ± 12,41		58,63 ± 11,67
	63,16 ± 13,15	62,0 ± 10,14	
<b>Geschlecht</b> (m/w)	33 (66%) / 17 (34%)		7 (43,8%) / 9 (56,2%)
	25 (65,8%)/ 13 (34,2%)	8 (66,7%)/ 4 (33,3%)	
<b>Liegedauer Intensivstation</b> (in Tagen)**	19,17 ± 17,05		-
	20,97 ± 19,10	13,45 ± 4,458	
<b>SOFA Aufnahmetag Intensivstation**</b>	10,46 ± 3,69		-
	10,24 ± 3,50	11,17 ± 4,324	

\* bezogen auf die 28-Tage Sterblichkeit

\*\* als Mittelwert mit Standardabweichung

### 3. Material und Methodik

Tab. 6 **Abnahmeprotokoll**

Abnahmezeitpunkt	Patienten	Kontrollen
Tag 1,3,5,7 sowie post Sepsis	2* RNA-Isolationsröhrchen 1* Vollblut im Serumröhrchen 1* Citrat Vollblut– ab Pat. 25	-
einmalig	1* Kalium EDTA Vollblut	2* RNA-Isolationsröhrchen 1* Citrat Vollblut 2* Lithium Heparin Vollblut 1* Kalium EDTA Vollblut

Tab. 7 **Verwendung der Proben**

Probenart	Durchgeführte Messungen
Kalium EDTA Vollblut	Genpolymorphismen (SNP)
RNA-Isolationsröhrchen (PAXgene)	RNA-Isolation, qPCR
Citrat Vollblut → Plasma	ELISA
Vollblutröhrchen → Serum	ELISA
Lithium-Heparin Vollblut	Heminstimulation

#### 3.5. Genotypisierung

Die Genotypisierung mit Hilfe der klassischen Sanger Sequenzierung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. med. C. Sponholz durchgeführt. Es handelt sich dabei um die sogenannte Didesoxymethode. Zunächst wird dabei die DNA durch eine PCR vervielfältigt. Dann wird die doppelstrangige DNA durch Hitze denaturiert. Anschließend werden die dadurch entstandenen Einzelstränge in vier Ansätzen mit jeweils einer der verschiedenen fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden versetzt. Diese verbinden sich je nach Sequenz mit dem Basenende. Da den Didesoxynukleotiden die Hydroxygruppe am Ende der Sequenz fehlt, ist keine Verlängerung der Basensequenz nach der Bindung eines Didesoxynukleotids möglich. Dadurch entstehen Abschnitte verschiedener Längen. Die verschiedenfarbigen Fluoreszenzen der Didesoxynukleotide werden durch einen Detektor analysiert und anhand ihrer Länge einer bestimmten Position in der Basensequenz zugeordnet. Anschließend kann aus dem sogenannten Chromatogramm die Sequenz ermittelt werden (Sanger et al. 1977). Dabei wurden sogenannten SNPs (single nucleotide polymorphisms) untersucht.

### 3. Material und Methodik

#### 3.6. Expressionsanalyse

##### 3.6.1. RNA-Isolation

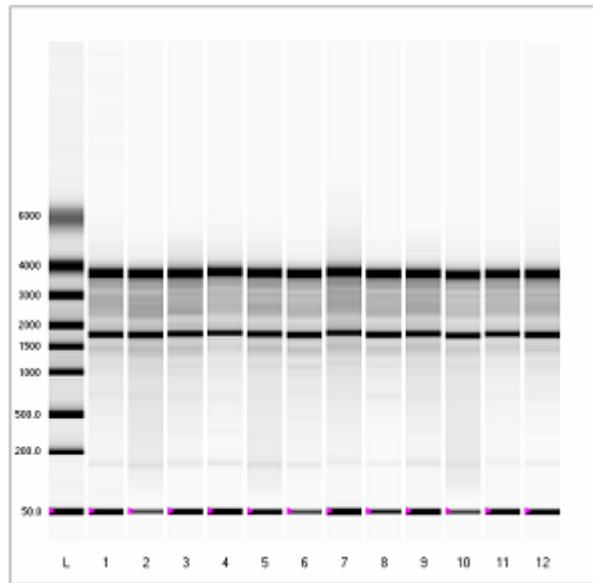
Das Blut wurde mit PAXgene™ Röhrchen abgenommen. Diese enthalten eine spezielle Substanz zur unmittelbaren Stabilisierung der RNA und ermöglichen damit eine standardisierte Auswertung der Genexpressionsdaten.

Die bei -80°C konservierten PAXgene™ Röhrchen wurden mithilfe des QIAcubes und laut Herstelleranweisung des PAXgene™ Blood RNA Kit isoliert. Als Modifikation wurden drei mal zwei Sekunden lange Homogenisierungen (zweimal 10 Prozent cycle, 30 Prozent power) mit dem Ultraschallhomogenisator vorgenommen, da die Pellets teilweise kaum löslich waren. Anschließend erfolgte die Messung des RNA-Gehaltes per Nanodrop™. Hierbei wurde jeweils 1µl der Flüssigkeit spektrophotometrisch bei 260nm und 280nm vermessen und quantifiziert. Proben ab einem Wert von 30ng/µl wurden als akzeptabel eingestuft.

##### 3.6.2. Qualitätskontrolle (Experion™)

Die isolierte RNA wurde anschließend mit dem Elektrophoresegerät Experion™ auf eine hinreichende Qualität für das weitere Verfahren überprüft. Das Prinzip beruht auf einer laserinduzierten Fluoreszenzmessung. Es wurde nach den Herstelleranweisungen des Experion™ RNA StdSens Analysis Kits vorgegangen. Zum Schluss wurden RNA Quality Indicator (RQI) Werte von minimal 7,0 sowie eine regelrechte Darstellung des virtuellen Geles als akzeptabel gewertet. Der RQI ist ein Indikator für die Integrität der RNA. Der Wert 1,0 steht dabei für eine maximal degradierte RNA, während 10,0 eine vollständig intakte RNA anzeigt (Abb.2). Dabei sind Schwankungen zwischen verschiedenen Gewebetypen zu berücksichtigen (Denisov et al. 2008).

### 3. Material und Methodik



**Abb.2** Beispiel eines **virtuellen Gels** des Experion™-Systems **zur Überprüfung der RNA Qualität**. Dargestellt von oben nach unten: 28S Bande bei etwa 3800 18S Bande bei etwa 1800 sowie der aufgetragene Marker bei 50. Parallele Auftragung von maximal 12 Proben sowie der RNA Leiter (L) zur Quantifizierung.

#### 3.6.3. cDNA-Synthese

Die auf Qualität (RQI  $\geq 7,0$ ) und Quantität (mind. 30ng/ $\mu$ l) überprüften Proben wurden anschließend mit dem RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit in cDNA umgeschrieben.

Dabei wurden die Proben mit RNase freiem Wasser auf 30ng/ $\mu$ l äquilibriert. Es folgte eine spektrophotometrische Überprüfung der Konzentration per Nanodrop™. Daraufhin wurden für die Proben ein Präinkubationsmix von jeweils 1,2 $\mu$ l Oligo(dT)Primer und 1 $\mu$ l Random Hexamer hergestellt und jeweils 2,2 $\mu$ l dessen auf die Proben gegeben. Hierauf folgte eine fünfminütige Denaturierung bei 65°C im Thermocycler. Die denaturierten und auf Eis abgekühlten Proben wurden nun mit 8 $\mu$ l des Maininkubationsmixes versetzt. Der Maininkubationsmix enthielt pro Probe 4 $\mu$ l 5xReaction Buffer, 2 $\mu$ l dNTPs, 1 $\mu$ l Ribolock RNase Inhibitor und 1 $\mu$ l Revert Aid Reverse Transkriptase. Anschließend wurden die mit dem Maininkubationmix versetzten und gut durchmischten Proben 5 Minuten bei 25°C, dann 60 Minuten bei 42°C und 5 Minuten bei 70°C inkubiert. Abschließend wurden die Proben auf 5ng/ $\mu$ l für die anschließende qPCR mit RNase freiem Wasser verdünnt und bei -20°C bis zur Messung gelagert.



### 3. Material und Methodik

#### 3.6.4. Primersynthese

Verwendete Primer (Hersteller: biomers.net)

Primername	Sequenz (5'-3')
HMOX1 (102bp)	fw: CCA GCA ACA AAG TGC AAG ATT rv: GTG TAA GGA CCC ATC GGA GA
BLVRA (136bp)	fw: CTCAGGAACTGTGGGAGCTG rv: AAGAGGAGCGACCCCTTTCAG
BLVRB (117bp)	fw: CCTGAAGTACGTGGCTGTGA rv: CCCAGGTCATGTTTGGAGAT
S100A8	fw: GCTAGAGACCGAGTGTCTCTCA rv: ACGCCCATCTTTATCACCAG
S100A12	fw: AGAGCATCTGGAGGGAATTG rv: TGCAAGCTCCTTTGTAAGCA
ACTB	fw: GGC ATG GGT CAG AAG GAT T rv: AGG TGT GGT GCC AGA TTT TC
GAPDH	fw: CTC TGC TCC TCC TGT TCG AC rv: CAA TAC GAC CAA ATC CGT TGA C

Die Primer wurden mithilfe von Primerdatenbanken (siehe Kapitel: Datenbanken) erstellt. Es erfolgte ein Vergleich der ermittelten Genomabschnitte mittels des Programmes BioEdit<sup>TM</sup>, um inkorrekte Sequenzen aufzudecken. Die so ermittelten Sequenzen wurden in Teilen mit <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/> auf mögliche Primersequenzen untersucht.

Der Erstellung von Primern wurden folgende Kriterien zugrunde gelegt:

- Größe des PCR Produktes zwischen 100-120 Basenpaare
- Größe der Primer zwischen 18 bis 22 Basenpaare
- GC Anteil innerhalb der Primer 45 bis 50 Prozent, um eine optimale Bindung des Primers zu gewährleisten
- Überspannen eines Introns durch den Primer (Intronspanning), um gDNA Kontamination der cDNA zu vermeiden
- Flankieren eines Introns mit dem Primer, um gDNA Kontamination der cDNA zu vermeiden

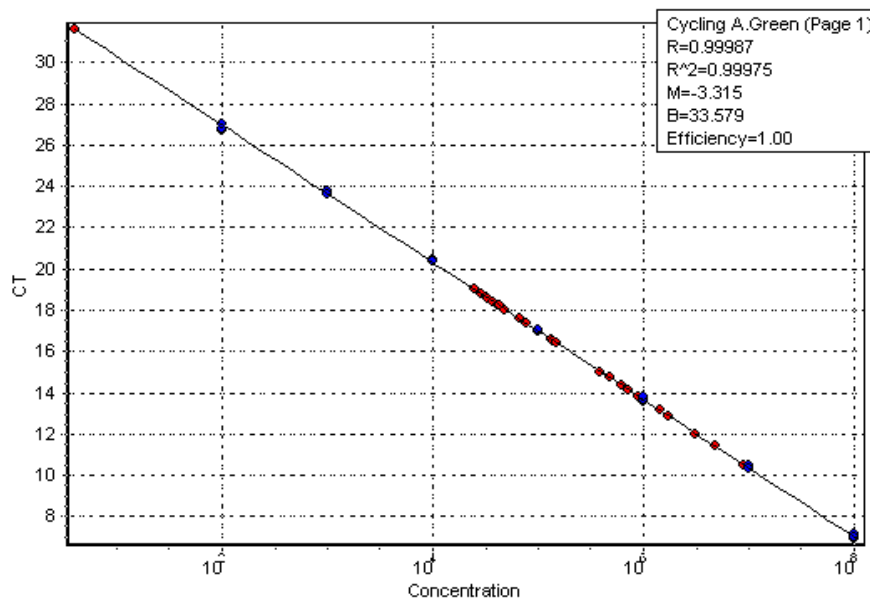
### 3. Material und Methodik

- Schmelztemperatur (TM) zwischen 50 und 60°C, um eine optimale Anlagerung des Primers ohne Entstehen von unspezifischen Basenpaarungen zu ermöglichen.

Anschließend wurden die unter diesen Kriterien hergestellten Primer mit Hilfe eines BLAST (siehe Kap. 3.2) auf analoge Sequenzen innerhalb des Genoms untersucht, um die Spezifität für den zu analysierenden Genomabschnitt zu garantieren.

Die so überprüften Primer wurden in einem Probelauf auf Funktionalität überprüft. Als Kriterium diente die Schmelztemperaturkurve. Die dabei entstandenen PCR-Produkte wurden nach Herstellerprotokoll mit dem MinElute™ PCR Purification Kit aufgereinigt.

Anschließend wurden sie mit dem Nanodrop™ Spektrophotometer auf ihren DNA Gehalt geprüft und auf 10ng/μl äquilibriert. Für die weiteren Messungen wurden diese zur Ermittlung der Effizienz eines PCR-Laufes verwendet.



**Abb. 3** Beispiel einer **Effizienzmessung** für die **qPCR**. Auftragung der PCR-Produkte mit bestimmter Konzentration zur Überprüfung der Effizienz jedes einzelnen PCR-Laufes

#### 3.6.5. qPCR

##### 3.6.5.1. Prinzip

Die sogenannte Polymerasekettenreaktion (PCR) wird zur Vervielfältigung von Genabschnitten verwendet, um diese anschließend zu analysieren. Dazu werden zunächst die cDNA-Stränge bei circa 90°C denaturiert und in Einzelstränge gespalten. Anschließend erfolgt die sogenannte Hybridisierung, bei der bei circa 60°C die Primer an die Einzelstränge angelagert werden. Durch die darauffolgende Polymerisation bei ca. 70°C werden mithilfe der hitzebeständigen Taq-Polymerase

### 3. Material und Methodik

die Einzelstränge mit den angelagerten Primern zu Doppelsträngen polymerisiert. Dabei wird die DNA verdoppelt. Bei der quantitativen PCR erfolgt zusätzlich eine Quantifizierung der Expression mithilfe von interkalierenden Farbstoffen (hier SYBR 2). Diese intensivieren ihre Fluoreszenz bei der Bindung an die DNA. Diese wird anschließend vermessen. Danach wird die Signalintensität mit einer Eichkurve verglichen, um eine Quantifizierung vorzunehmen. Zur Erstellung der Eichkurve wurden die zuvor hergestellten, aufgereinigten und quantifizierten PCR-Produkte verwendet. Die Eichgerade ist spezifisch für jeden Lauf und jeden Primer. Weiterhin wird damit die sogenannte Effizienz des jeweiligen PCR Laufes bestimmt. Diese ist wichtig, um anhand der Pfaffl-Formel eine relative Quantifizierung vornehmen zu können (Pfaffl 2001). Hierbei wird das Expressionslevel des Zielgenes mit dem Expressionslevel einer oder mehrerer sogenannter „Housekeepergene“ verglichen. Ein „Housekeepergen“ ist ein relativ stabil exprimierter Genomabschnitt, der beispielhaft für das Regulierungslevel des Genoms steht. Dazu wurden Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Actin beta (ACTB) verwendet. Dadurch wird eine Unterscheidung zwischen allgemein hoher Expression im Genom und einer speziellen Hochregulierung des zu untersuchenden Genes gewährleistet.

Die Reaktionsansätze wurden mit Hilfe des zuvor programmierten automatischen Pipettierroboters CAS-1200™ hergestellt. Dabei wurden zunächst per Hand die nötigen Primermixe erstellt.

1. Herstellung der 100µM Stammlösung der Primer
2. Herstellung von 1ml 2µM Primermixes, bestehend aus jeweils 20µl der 100µM Stammlösung von forward und reverse Primer und 960µl DEPC-Wasser

Anschließend pipettierte der Pipettierroboter jeweils 10µl des Brilliant SYBR® Green qPCR Master Mix, 5µl 2µM Primermix und 5µl cDNA Probe zusammen. Die so hergestellten 500nM Reaktionsmixe wurden am Rotor-Gene vermessen.

Zur relativen Quantifizierung der Proben fand die sogenannte Pfaffl-Formel (Pfaffl 2001) Anwendung.

$$ratio = \frac{(E_{Zielgen})^{\Delta CP_{Zielgen}(Kontrolle - Behandlung)}}{(E_{Referenzgen})^{\Delta CP_{Referenzgen}(Kontrolle - Behandlung)}}$$

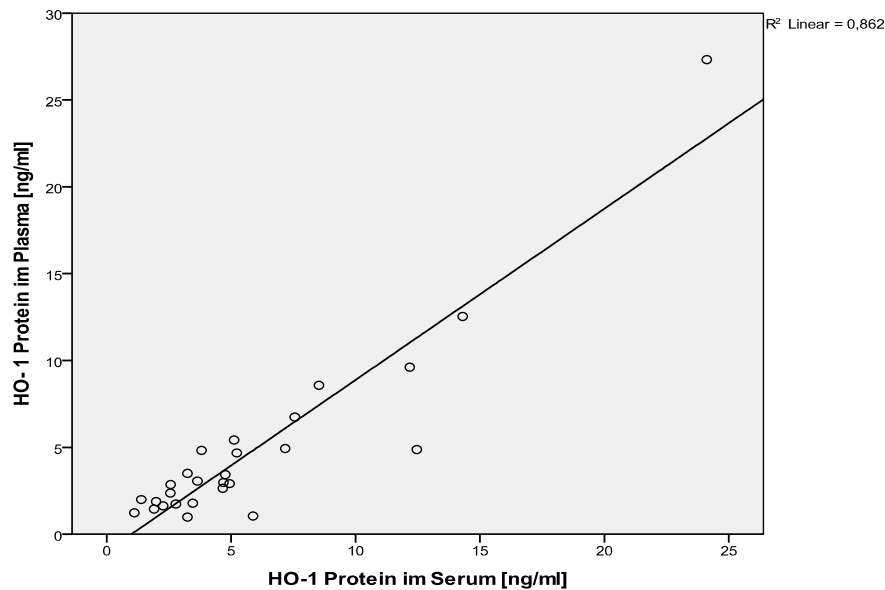
### 3. Material und Methodik

#### 3.7. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Zur Quantifizierung des Proteingehaltes wurden je 100µl Plasma bzw. Serumproben laut Herstellerprotokoll des Human HO-1 ELISA Kit behandelt. Hierbei wird ein sogenannter quantifizierter sandwich Immunassay verwendet. Dabei waren die ELISA-Platten mit einem monoklonalen Mausantikörper für HO-1 beschichtet. An diesen band das in der Probe enthaltene Protein HO-1 und wurde anschließend mit einem HO-1 spezifischem polyklonalen Antikörper markiert. An diesen Antikörper band sich ein sekundärer antiKaninchen IgG Antikörper, an den die horseradish-Peroxidase gekoppelt war. Anschließend wurde Tetramethylbenzidin hinzugegeben, welches eine blaue Färbung hervorrief. Mit einer sauren Stop-Lösung wurde die Farbentwicklung abgestoppt und in Gelb umgewandelt. Danach wurde die Probe bei 450nm im Molecular devices Thermomax microplate reader vermessen. Die Waschschrte erfolgten durch den automatischen TecanWasher™. Die Absorbanzen wurden mit einer Standardkurve verglichen. Diese wurden pro Lauf aus dem mitgelieferten Standard erstellt.

Da nicht von allen Proben Plasma zur Verfügung stand, erfolgte eine Korrelationsanalyse zwischen Plasma und Serum (Abb.4). Die Proben wurden doppelt vermessen und die Messwerte anschließend gegeneinander aufgetragen. Dabei ist bei einem Korrelationskoeffizienten von 0.929 nach Pearson von einer starken Korrelation der unterschiedlichen Medien auszugehen. Deshalb wurden in der Auswertung die Probenarten als annähernd äquivalent eingestuft und dementsprechend in der Berechnung berücksichtigt.

### 3. Material und Methodik



**Abb. 4 Korrelation des HO-1 Proteingehaltes im Serum und im Plasma**

### 3.8. Klinische Daten

#### 3.8.1. COPRA-System

Die klinischen Daten wurden mittels des COPRA-Systems der Intensivstationen der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin des Universitätsklinikums Jena erhoben. Die Daten wurden anonymisiert gespeichert. Folgende Parameter wurden dabei erfasst:

- biographische Daten (Alter, Geschlecht)
- Dauer des Aufenthaltes auf Intensivstation
- Score zur Bestimmung der Erkrankungsschwere (SOFA)
- Mortalität (Intensivstation, 28-Tage)
- Laborparameter (Bilirubin)

#### 3.8.2. Bestimmung des Bilirubins

Der Laborparameter Bilirubin wurden der COPRA-Akte des Patienten entnommen. Er wurde routinemäßig im Labor des Institutes für Klinische Chemie in Jena bestimmt.

Folgende Methode fand dabei Anwendung:

Das direkte Bilirubin wurde durch den direct bilirubin Test von Abbot™ clinical chemistry durchgeführt. Das Verfahren beruht auf der Diazo-Reaktion. Dabei reagiert direktes Bilirubin mit einem Diazonium-Salz in Anwesenheit von Sulfamidsäure und wird zu der farbigen Verbindung

### 3. Material und Methodik

Azobilirubin. Die durch das Azobilirubin hervorgerufene Extinktionszunahme ist dabei proportional zur Konzentration des Bilirubins.

#### 3.8.3 SOFA Score

Zur näheren Charakterisierung und Schweregradbeurteilung des Multiorganversagens wurde der SOFA Score verwendet (Ferreira et al. 2001). Der SOFA Score gilt als einfache und zuverlässige Methode, um den Grad der Organdysfunktion in kritisch kranken Patienten zu beschreiben und eine Aussage bezüglich deren Überlebenswahrscheinlichkeit im Verlauf zu treffen. Besonders durch mehrmalige Messung scheint die Genauigkeit und Stärke der Aussagekraft dieses Scores zu profitieren (Vincent et al. 1998). Dieser wird auf der Intensivstation der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin in Jena routinemäßig im Verlauf erhoben (Minne et al. 2008).

#### 3.9. Hemin- und Bilirubinstimulation

Um die mRNA Expression der Hämoxygenase-1 in Abhängigkeit vom Genotyp näher zu bestimmen, wurde bei den 16 gesunden Probanden der Kontrollgruppe eine **ex-vivo Heminstimulation** durchgeführt. Dabei wurden die Konzentrationen der ersten durchgeführten in-vivo Stimulation mit Hemin zugrunde gelegt (Bharucha et al. 2010). Hemin gilt als der stärkste Induktor der Hämoxygenase-1 (Bharucha et al. 2010, Otterbein und Choi 2000).

Es wurden zweimal 9ml Blut mit Lithium-Heparin-Plasma Röhrchen entnommen. Diese wurden in 6 Röhrchen zu je 2,75ml aufgeteilt. Die Röhrchen wurden mit 6,88µl unterschiedlich konzentrierten Heminlösungen stimuliert (Konzentrationen siehe Tab. 8). Das Hemin wurde dabei in äquimolaren Mengen 1N Natriumhydroxid gelöst und mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt.

### 3. Material und Methodik

Tab. 8 Heminkonzentrationen der Reaktionsansätze

Röhrchennummer	Heminlösung
1	-
2	0,5mg/ml
3	0,1mg/ml
4	0,05mg/ml
5	0,005mg/ml
6	0,00005mg/ml

Die so hergestellten Ansätze wurden 4 Stunden im langsam schüttelndem Wasserbad bei Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Proben 10 Minuten bei 4°C mit 400g zentrifugiert. Es wurde jeweils 275µl Plasma abgenommen und bei -20°C eingefroren. Im Anschluss wurde der Rest in PAXgene Röhrchen umgefüllt und 24 Stunden inkubiert, bevor diese bei -20°C eingefroren wurden. Daraufhin folgte, wie in Kapitel 3.6. beschrieben, zunächst eine RNA-Isolation mit anschließender Qualitätskontrolle. Danach wurde eine cDNA-Synthese und eine qPCR mit dem Zielgen HMOX1 sowie ACTB als Referenzgen durchgeführt.

Im Laufe der Arbeit stellte sich durch statistische Zwischenauswertungen die Frage, ob es auch eine Abhängigkeit der mRNA-Expression der Hämoxygenase-1 von der Bilirubinkonzentration gäbe. Daher wurde analog zur bereits beschriebenen Heminstimulation eine **ex-vivo Bilirubinstimulation** durchgeführt. Hierbei wurden vier freiwillige Probanden untersucht.

#### 3.10. Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit SPSS<sup>TM</sup> 18 und 19<sup>TM</sup> durchgeführt. Je nach Fragestellung wurden der Korrelationskoeffizient nach Pearson bzw. Spearman, der Regressionskoeffizient und zum Vergleich der verschiedenen Untergruppen der Mann Whitney U Test, Kruskal Wallis H, das allgemein lineare Modell oder eine one-way ANOVA zur Analyse angewendet. Alle Fragestellungen wurden auf einem Signifikanzniveau von 95 Prozent berechnet ( $p \leq 0,05$ ). Die Daten wurden im Sinne des „Last observation carried forward“ Prinzips vervollständigt (Mallinckrodt et al. 2003).

### 3. Material und Methodik

Sofern der Begriff **Mortalität** verwendet wird, ist, wenn nicht explizit anders erwähnt, die 28 Tage Mortalität gemeint.

Sofern **Boxplots** als Darstellungsform gewählt wurden, gelten folgende Festlegungen der einzelnen Grafikbestandteile:

- der mittlere Strich stellt den Median dar
- die oberen und unteren Begrenzungen der Box werden durch die 25iger und 75iger Perzentile gebildet
- die oberen und unteren Whiskers stellen die letzten nicht extremen Werte dar
- die o sind als Ausreißer definiert, die Werte zwischen dem anderthalb bis dreifachen der Boxhöhe darstellen
- die  $\Delta$  stehen für extreme Werte über dem dreifachen der Boxhöhe.



## 4. Ergebnisse

### **4. Ergebnisse**

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse sind teilweise veröffentlicht in:

Sponholz C, Huse K, Kramer M, Giamarellos-Bourboulis EJ, Claus RA, Kern A, Engel C, Kuhnt E, Kiehntopf M, Routsis C, Mylona V, Tsangaris I, Heinemann SH, Reinhart K, Platzer M, Bauer M. 2012. Gene polymorphisms in the heme degradation pathway and outcome of severe human sepsis. Shock, 38 (5):459-465.

#### **4.1 Patientencharakterisierung**

In die vorliegende Studie wurden initial 50 Patienten mit schwerer Sepsis, septischem Schock und Multiorganversagen unterschiedlicher Ursache eingeschlossen, die auf den Intensivstationen des Universitätsklinikums Jena vom 26.04.2008 bis zum 15.03.2010 behandelt wurden. Als Kontrollgruppe dienten 16 gesunde Freiwillige mit ähnlicher Alterszusammensetzung. Eine nähere Beschreibung der Kohorte sowie die zugrundeliegenden Einschlusskriterien finden sich im Kapitel 3.4. Diese Kohorte wurde für einzelne Betrachtungen um weitere 42 Patienten mit schwerer Sepsis, septischem Schock und Multiorganversagen ergänzt, welche lediglich bei der Auswertung der funktionellen Genomik in ihrer Gesamtheit berücksichtigt wurden (Tab.10).

##### **4.1.1. Gesamtbilirubin**

Um eine adäquate Charakterisierung der vorliegenden Patientenkohorte zu gewährleisten, wurden verschiedene Parameter ausgewählt. Als standardisiert gemessener Wert rückte das Gesamtbilirubin zunächst in den Blickpunkt. Im Rahmen des Hämabbaus kommt Bilirubin die Funktion eines Stoffwechselendproduktes zu. Gesamtbilirubin wird als einziger Wert aus dem Bereich der Abbauprodukte des Hämstoffwechsels routinemäßig auf der Intensivstation erhoben und konnte den COPRA (Computer Organized Patient Report Assistant)-Akten der Patienten entnommen werden.

## 4. Ergebnisse

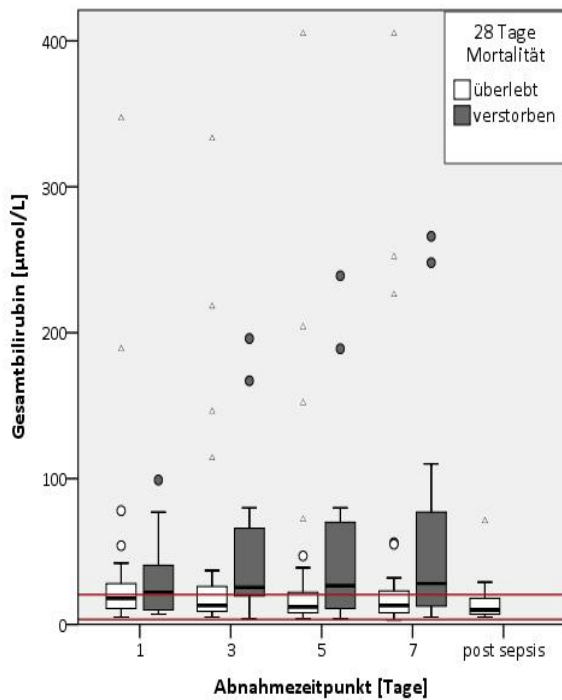


Abb.5A **Gesamtbilirubingehalt im Zeitverlauf stratifiziert nach 28-Tage Mortalität.** Die roten Striche stehen für den Referenzbereich gesunder Erwachsener (95iger Intervall).

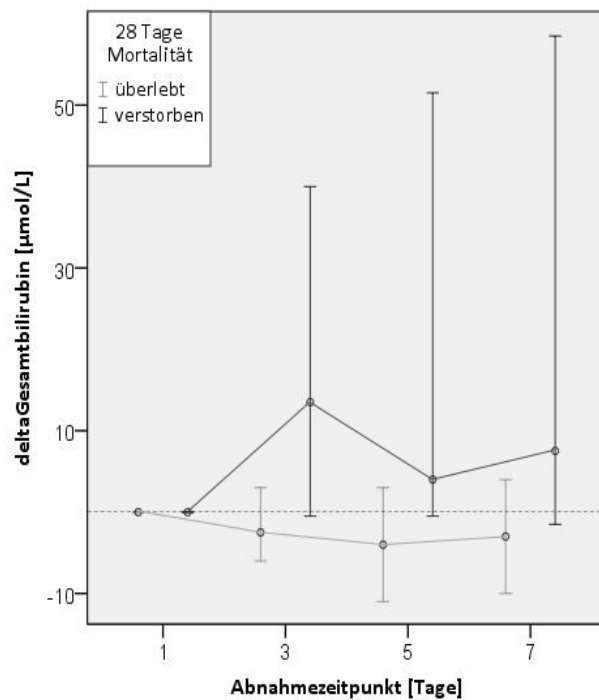


Abb.5B **Veränderung des Gesamtbilirubins normalisiert auf Tag 1 stratifiziert nach 28-Tage Mortalität.** Hierbei ist der Mittelpunkt der Median. Die beiden Endstriche zeigen die 25iger und 75iger Perzentile.

Ein signifikanter Einfluss des Abnahmezeitpunktes ( $p=0,011$ ) sowie eine Interaktion des Zeitpunktes und der 28-Tage Mortalität ( $p=0,042$ ) mit dem Bilirubinwert konnten ermittelt werden. Ein signifikanter Einfluss des Parameters 28-Tage Mortalität im Zeitverlauf konnte nicht nachgewiesen werden. Es ist eine erhöhte Mittelwert in der Gruppe der nach 28 Tagen Verstorbenen ab Tag 3 gegenüber den später Überlebenden zu beobachten. Ebenfalls lässt sich eine relative Erhöhung der Bilirubinwerte in Bezug zu Tag 1 bei den später verstorbenen Patienten nachweisen (Abb. 5B). Die als Ausreißer bzw. extreme Werte gekennzeichneten Werte sind meist einem Patienten im Zeitverlauf zuzuordnen. Dies lässt sich auf die unterschiedlichen Grade der Leberschädigung der Patienten zurückführen, die auch im Zeitverlauf deutlich über denen der Restkohorte liegen (Abb. 5A).

## 4. Ergebnisse

### 4.1.2. mRNA-Expression der stressrelevanten Transkripte von S100A8 und S100A12

Um weitere postulierte Sepsismarker (Payen et al 2008) auf ihr Diskriminationspotenzial zu überprüfen und die Patientenkohorte näher zu charakterisieren, wurden S100A8 und S100A12 als Biomarker der Inflammation auf Transkriptionsniveau ausgewählt. Die RNA wurde aus zirkulierenden Leukozyten isoliert und mithilfe der qPCR analysiert.

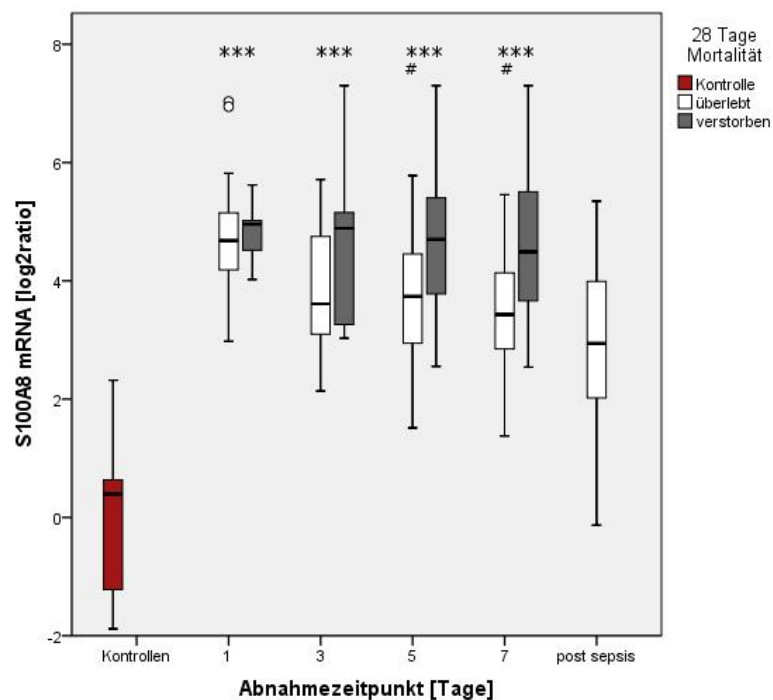


Abb.6 **S100A8 mRNA-Expression im Zeitverlauf stratifiziert nach 28-Tage Mortalität.** Hierbei stehen \* für die Unterscheidung zwischen Kontrollen und Patienten (\*\*\*)  $p < 0,001$ ). Während # für die Unterscheidung zwischen Überlebenden und Verstorbenen stehen (#  $p < 0,05$ ).

## 4. Ergebnisse

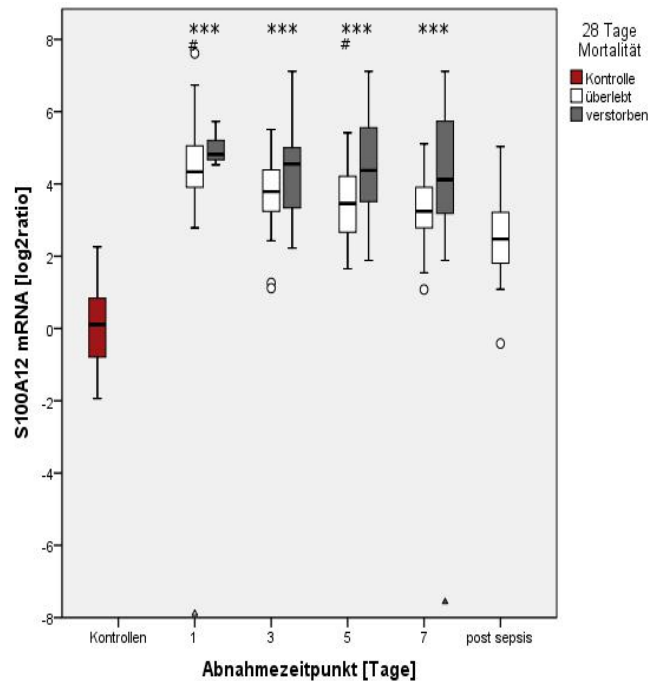


Abb.7 **S100A12 mRNA-Expression im Zeitverlauf stratifiziert nach 28-Tage Mortalität.** Hierbei stehen \* für die Unterscheidung zwischen Kontrollen und Patienten (\*\*\*)  $p < 0,001$ ). Während # für die Unterscheidung zwischen Überlebenden und Verstorbenen stehen (#  $p < 0,05$ ).

Dabei konnten bei beiden Transkripten jeweils an allen vier Abnahmezeitpunkten ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen nachgewiesen werden (Abb. 6,7, MWU, jeweils  $p < 0,001$ ). Teilweise war ebenfalls eine signifikante Unterscheidung zwischen überlebenden und verstorbenen Patienten nachweisbar (MWU S100A8 Tag 5  $p = 0,048$  Tag7  $p = 0,021$ ; S100A12 Tag1  $p = 0,042$ , Tag 5  $p = 0,015$  Tag7  $p = 0,067$ ).

### 4.1.3. SOFA Score

Der SOFA Score als bewährter Parameter zur Beschreibung einer Multiorgandysfunktion bei Sepsis wurde ebenfalls in die Beschreibung aufgenommen. Dieser beinhaltet unter anderem die Bilirubinwerte (Abb.5A und 5B).

## 4. Ergebnisse

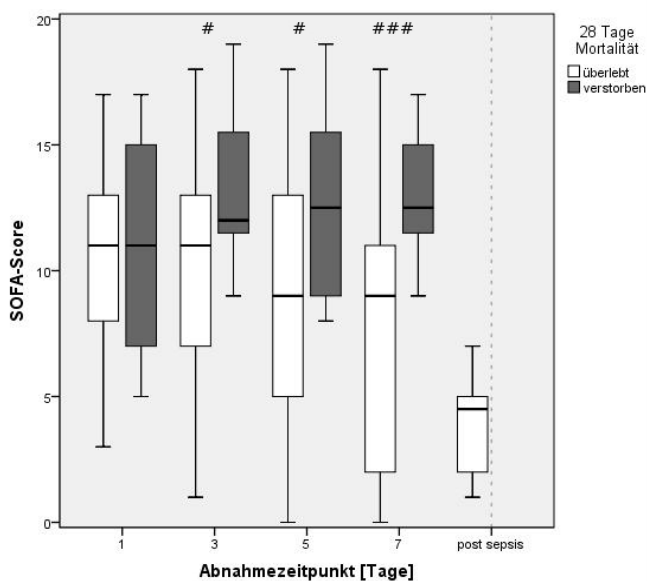


Abb.8A SOFA-Score über den Zeitverlauf stratifiziert nach 28-Tage Mortalität. Hierbei stehen # für die Unterscheidung zwischen Überlebenden und Verstorbenen (#  $p < 0,05$ , ###  $p < 0,001$ ).

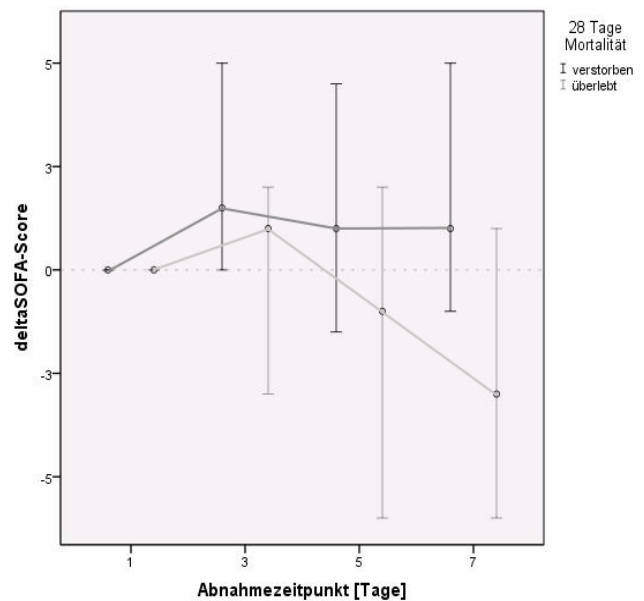


Abb.8B Veränderung des SOFA-Scores ( $\Delta$ SOFA-Score) normalisiert auf Tag 1 stratifiziert nach der 28-Tage Mortalität. Hierbei ist der Mittelpunkt der Median. Die beiden Endstriche zeigen die 25iger und 75iger Perzentile.

Hierbei ließ sich eindrücklich eine Unterscheidung zwischen nach 28-Tagen Überlebenden und Verstorbenen ab Tag 3 ermitteln (Abb. 8A, MWU Tag3  $p=0,022$ , Tag5  $p=0,046$ , Tag7  $p<0,001$ ).

Ebenfalls konnte ein signifikanter Einfluss der 28-Tage Mortalität ( $p=0,006$ ) sowie eine Interaktion zwischen Abnahmezeitpunkt und der 28-Tage Mortalität ( $p=0,012$ ) mit dem Verlauf des SOFA Scores festgestellt werden.

Der  $\Delta$ SOFA-Score ermöglicht eine Unterscheidung in nach 28 Tagen-Überlebende und Verstorbenen ab dem 3. Tag (Abb. 8B).

Dies bestätigt das gute Diskriminationspotenzial des SOFA-Scores, sowie die adäquate Repräsentation beider Subgruppen des Überlebensstatus (Überlebende und Verstorbenen) in der untersuchten Patientenkohorte.

### 4.1.4. 28 Tage Mortalität in Abhängigkeit vom rs2071746 Genotyp

Der Einfluss des Genotypes der HMOX1, insbesondere des Single Nukleotid Polymorphismus (SNP) rs2071746 A(-419)T, welcher im Linkage Disequilibrium mit einem hochpolymorphen (GT)n-Mikrosatelliten steht, wurde ebenfalls untersucht (Buis et al. 2008). Der Einfluss dieses Genotypes

#### 4. Ergebnisse

wird bereits in der Literatur (Exner et al. 2004, Sheu et al. 2009, Buis et al. 2008) für verschiedene Krankheitsbilder beschrieben, eine konkrete Analyse im Hinblick auf die Mortalität bei Sepsis stand zur Zeit der experimentellen Arbeiten jedoch noch aus.

Tab.9 SNP Genotyp und 28 Tage Mortalität

		SNP Genotyp		
		TT (n=8)	AT (n=18)	AA (n=13)
28 Tage Mortalität	Überlebend	22,86% (n=6)	26,32% (n=13)	21,82% (n=10)
	verstorben	77,14% (n=2)	73,68% (n=5)	78,18% (n=3)

So konnte in der vorliegenden Kohorte eine geringere 28-Tage Mortalität für Patienten mit dem heterozygoten Genotyp AT als bei den homozygoten Genotypen TT und AA beobachtet werden (Tab.9). Dieser Unterschied ist allerdings nicht signifikant und steht in teilweisem Gegensatz zu den Ergebnissen der größeren Studie, von der das untersuchte Patientenkollektiv eine Subgruppe darstellt. Dort schien in einem Patientenkollektiv bereits das Vorhandensein eines A-Alleles einen negativen Einfluss auf den Outcome der Patienten zu haben (Sponholz et al. 2012). Dies könnte nicht zuletzt mit der geringeren Patientenanzahl erklärbar sein.

#### 4.2. HMOX1 mRNA Expression im Zeitverlauf

Um den Hämstoffwechsel genauer zu beurteilen, wurde als Parameter die mRNA Expression der Hämoxygenase-1, die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Hämabbaus katalysiert, mithilfe der qPCR in zirkulierenden Leukozyten analysiert (Tenhunen et al. 1968).

## 4. Ergebnisse

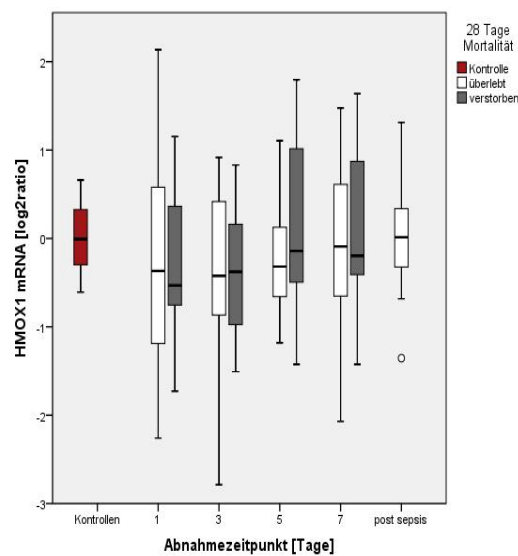


Abb.9 HMOX-1 mRNA-Expression im Zeitverlauf stratifiziert nach 28-Tage Mortalität.

In der vorliegenden Kohorte konnten dabei allerdings keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen, zwischen Überlebenden und Verstorbenen weder auf Intensivstation noch nach 28 Tagen nachweisbar (Abb.9).

### 4.3. HO-1 Proteinkonzentration

Nun ist selbstverständlich die mRNA-Expression der zirkulierenden Leukozyten nicht immer mit der Konzentration eines Proteins im Blut gleichzusetzen. Beispielsweise können andere Zellarten, wie Leberzellen, als Herkunftsort eine Rolle spielen. Zellzerfall oder Hypoxie sind weitere Faktoren, welche die Proteinkonzentration im Blut zusätzlich beeinflussen können (Karovic et al. 2007, Saukkonen et al. 2010, Sponholz et al. 2012).

Mithilfe eines Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assays (ELISA) wurde der Hämoxygenase-1 Proteingehalt (HO-1) näher untersucht.

#### 4. Ergebnisse

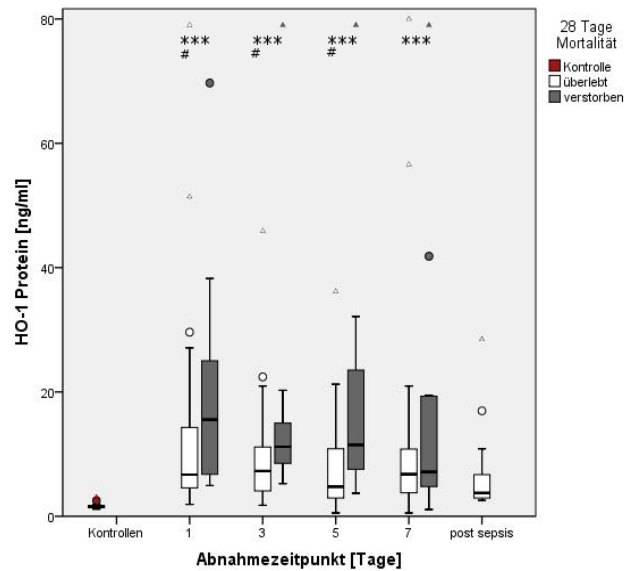


Abb.10 **HO-1 Proteinkonzentration im Zeitverlauf stratifiziert nach 28-Tage Mortalität.** Hierbei stehen \* für die Unterscheidung zwischen Kontrollen und Patienten (\*\* $p < 0,001$ ). Während # für die Unterscheidung zwischen Überlebenden und Verstorbenen stehen (#  $p < 0,05$ ).

Erstaunlicherweise konnte hierbei ein hochsignifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen (an allen Tagen  $p < 0,001$ ) nachgewiesen werden. Dies deutet klar auf eine Rolle der Hämoxygenase in der Pathogenese der Sepsis hin. Bei direkten Vergleichen konnten teilweise ebenso signifikante Unterschiede zwischen nach 28-Tage Überlebenden und Verstorbenen festgestellt werden (Abb.10, MWU Tag 1  $p = 0,036$ , Tag3  $p = 0,022$ , Tag 5  $p = 0,019$ ). Ebenfalls ist ein signifikanter Einfluss der 28-Tage Mortalität auf den Verlauf der HO-1 Proteinmessung vorhanden ( $p = 0,016$ ). Dies unterstreicht die potentielle Bedeutung der Hämoxygenase-1 im Krankheitsbild Sepsis.

In der vorliegenden Kohorte konnte keine Korrelation zwischen HMOX1 mRNA-Expression und HO-1 Proteingehalt beobachtet werden (Abb.11).



#### 4. Ergebnisse

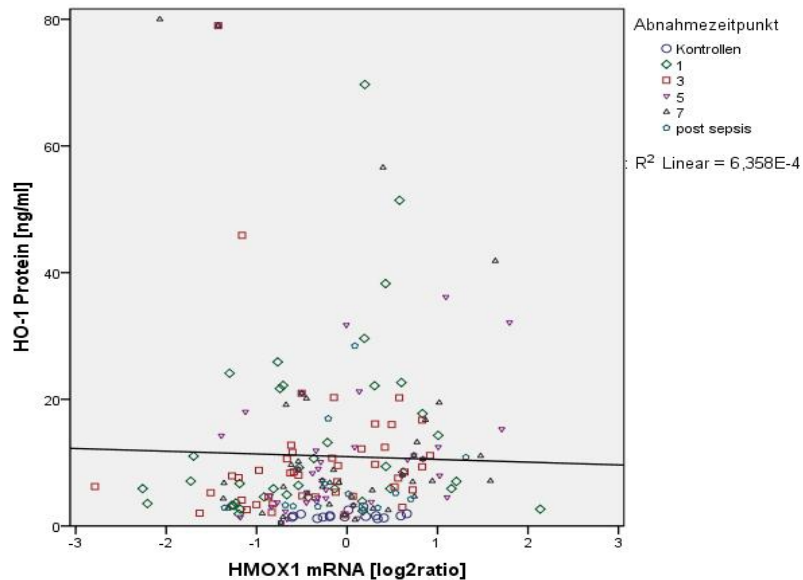


Abb.11 Punktdiagramm zum **Zusammenhang der HMOX1 mRNA-Expression mit der HO-1 Proteinkonzentration**

Dies kann als Hinweis auf verschiedene Induktionsmechanismen und Einflüsse gewertet werden, so z.B. den Einfluss des Zellzerfalls auf die HO-1 Proteinkonzentration .

Tab. 10 **HO-1 Protein Plasma Konzentration und rs2071746 Genotyp**

	HO-1 Plasma Konzentration [ng/ml]		
rs2071746 Genotyp	Kontrollen (n = 16)	Sepsis Tag 1 (n = 92)	Sepsis Tag 5 (n = 92)
A/A	1.75 (1.539)	11.53 (14.662)	6.71 (7.237)
A/T	1.74 (1.549)	10.97 (14.991)	5.81 (5.809)
T/T	1.53 (1.544)	8.83 (8.1)	6.84 (9.101)

Werte sind als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben

Weiterhin wurde als potentieller Einflussfaktor auf die HO-1 Proteinkonzentration im Plasma die Abhängigkeit vom rs2071746 Genotyp untersucht (Tab. 10). In Zusammenarbeit mit Dr.med. C. Sponholz wurden hierfür 92 Patienten und 16 Kontrollen genotypisiert und der Genotyp mit der resultierenden HO-1 Plasmakonzentration assoziiert. Hierbei fand sich kein Unterschied bezüglich der HO-1 Proteinkonzentration zwischen den einzelnen Genotypen (Sponholz et al. 2012). Darüber hinaus bestätigte sich die signifikante Induktion der Hämoxxygenase-1 auf Proteinebene in Patienten gegenüber den Kontrollen.

## 4. Ergebnisse

### 4.4. mRNA-Expression der Biliverdinreduktasen A und B

Dem Stoffwechselweg des Hämabbaues folgend wurden die Biliverdinreduktasen A und B hinsichtlich ihrer mRNA-Expression in zirkulierenden Leukozyten untersucht.

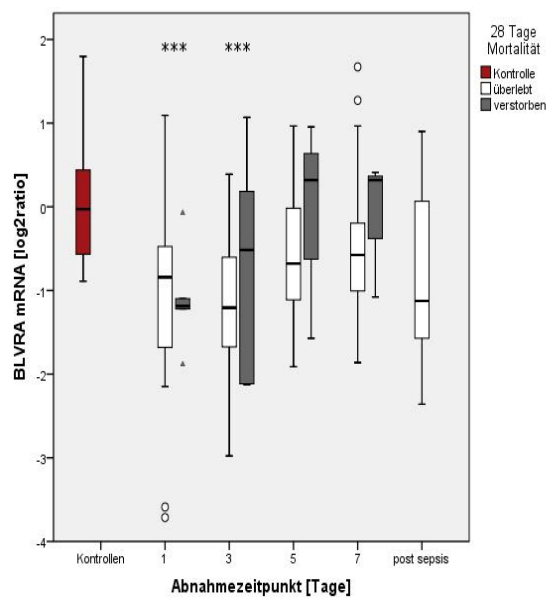


Abb.12A **BLVRA mRNA-Expression im Zeitverlauf stratifiziert nach 28-Tage Mortalität.** Hierbei stehen \* für die Unterscheidung zwischen Kontrollen und Patienten (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

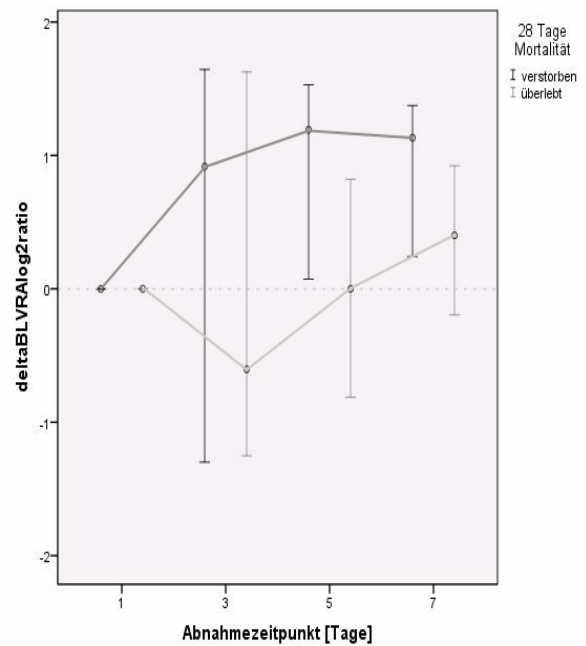


Abb.12B **Veränderung der BLVRA mRNA Expression normalisiert auf Tag 1 stratifiziert nach 28-Tage Mortalität.** Hierbei ist der Mittelpunkt der Median. Die beiden Endstriche zeigen die 25iger und 75iger Perzentile.

## 4. Ergebnisse

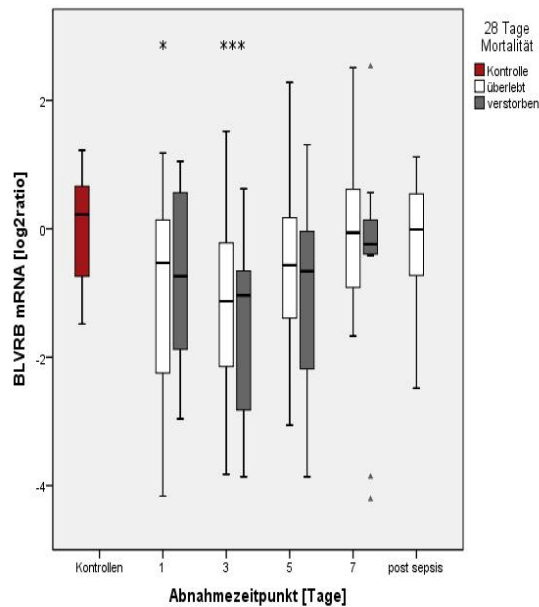


Abb.13A **BLVRB mRNA-Expression im Zeitverlauf normalisiert nach 28-Tage Mortalität.** Hierbei stehen \* für die Unterscheidung zwischen Kontrollen und Patienten (\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

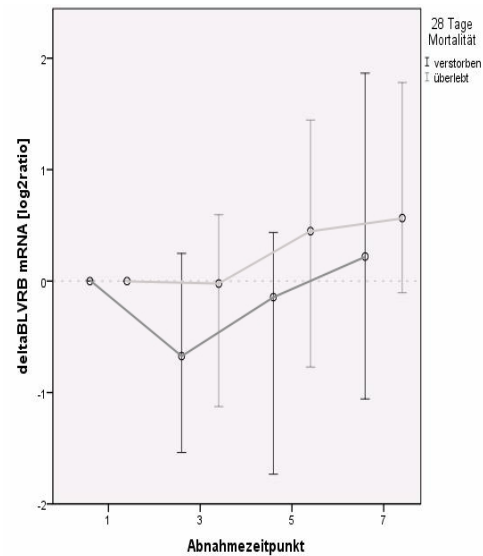


Abb.13B **Veränderung der BLVRB mRNA normalisiert auf Tag 1 stratifiziert nach 28-Tage Mortalität.** Hierbei ist der Mittelpunkt der Median. Die beiden Endstriche zeigen die 25iger und 75iger Perzentile.

Dabei konnten sowohl bei Biliverdinreduktase A als auch bei Biliverdinreduktase B ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen für die Tage 1 und 3 nachgewiesen werden (Abb. 12A, 13A; BLVRA Tag 1  $p=0,001$ , Tag3  $p=0,001$ ; BLVRB Tag1  $p=0,030$ , Tag3  $p=0,001$ ). Bei beiden Subtypen der Biliverdinreduktase wurde überraschend ein geringeres mRNA-Expressionslevel in Patienten als in der Kontrollgruppe beobachtet.

Bei der Biliverdinreduktase B konnte ein signifikanter Effekt des Abnahmezeitpunktes ( $p=0,008$ ) auf den Verlauf der mRNA-Expression berechnet werden.

Interessant ist bei beiden Enzymen, dass signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen nur an Tag 1 und 3 zu verzeichnen waren. Dies deutet auf eine zeitlich frühe Modifikation des Expressionslevels im Verlauf der Sepsis hin.

Erwähnenswert scheint das verschiedene Verhalten der Expressionslevel in Bezug auf Tag 1 (Abb. 12B, 13B, delta BVR). Während bei der Biliverdinreduktase A die nach 28 Tagen Verstorbenen die höheren Werte haben, zeigen sich bei der Biliverdinreduktase B höhere Werte für die später Überlebenden. Diese unterschiedlichen Verläufe könnten auf die geringere n-Anzahl bei der Biliverdinreduktase-A zurückzuführen sein.

## 4. Ergebnisse

Überraschenderweise ist somit bei den Biliverdinreduktasen keine Induktion der mRNA-Expression und damit auch keine Induktion des Hämabbaues feststellbar.

### 4.5. Heminstimulationsdaten

Um den Einfluss des Single Nukleotid Polymorphismus (SNP) rs2071746 A(-419)T auf die mRNA-Expression der HMOX1, sowie den HO-1 Proteingehalt näher zu untersuchen, wurde wie unter Kap 3.9. beschrieben eine in-vitro Heminstimulation durchgeführt. Hemin gilt als stärkster Induktor der Hämoxygenase (Tenhunen et al 1969, Otterbein et al 2000, Bharucha et al. 2010).

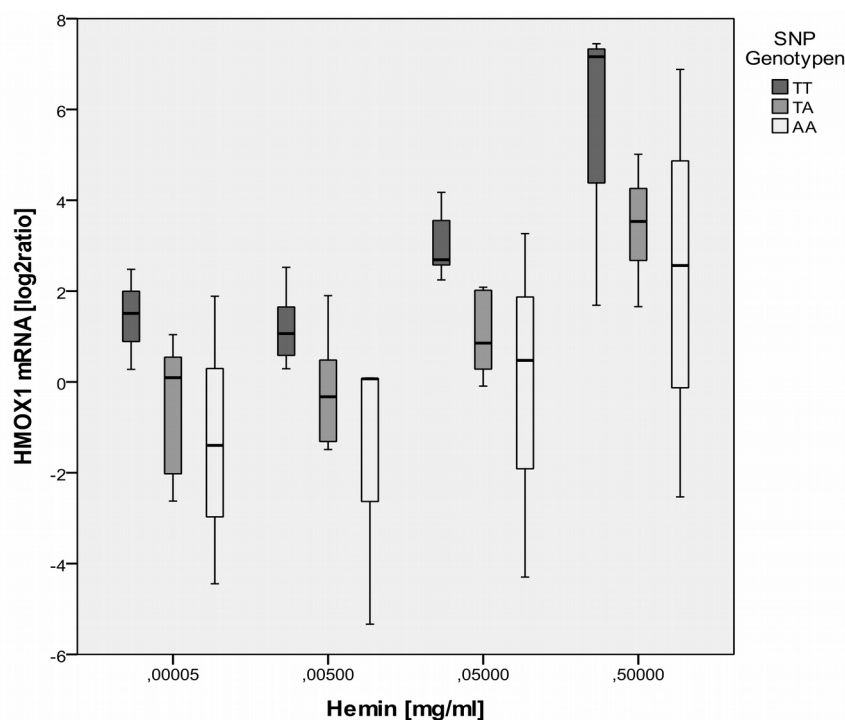


Abb.14 **HMOX1-mRNA Expression in Abhängigkeit von der Heminkonzentration und des SNP Genotypes**. Es wurden folgende Heminkonzentrationen verwendet: 0,5mg/ml, 0,05mg/ml, 0,005mg/ml und 0,00005mg/ml. Den Genotyp TT wiesen 5 Freiwillige, den Genotyp AT 7 Freiwillige und den Genotyp AA 4 Freiwillige auf.

#### 4. Ergebnisse

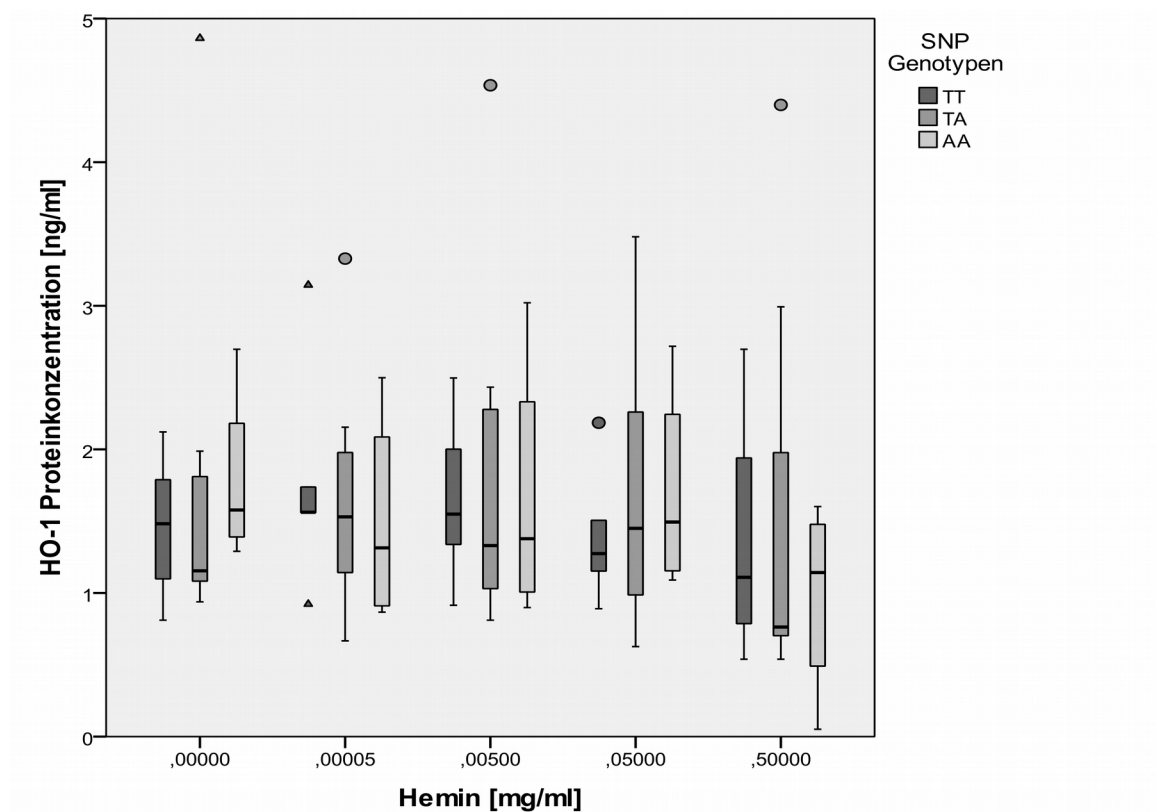


Abb.15 **HO-1 Proteinkonzentration im Serum/Plasma in Abhängigkeit von der Heminkonzentration und des SNP-Genotypes.** Es wurden folgende Heminkonzentrationen verwendet: 0,5mg/ml, 0,05mg/ml, 0,005mg/ml und 0,00005mg/ml. Den Genotyp TT wiesen 5 Freiwillige, den Genotyp AT 7 Freiwillige und den Genotyp AA 4 Freiwillige auf.

Die HMOX1 mRNA-Expression konnte bei allen drei Subgruppen deutlich induziert werden (Abb.14). Die stärkste Induktion war dabei bei den Probanden, die über den TT Genotyp verfügten, zu verzeichnen. Hier war sowohl der Einfluss von Hemin ( $p=0,004$ ) als auch die Interaktion zwischen Hemin und dem SNP Genotyp ( $p=0,039$ ) sowie des SNP Genotypes ( $p=0,018$ ) signifikant. Der Unterschied zwischen den einzelnen Subgruppen war leider nicht durchgehend signifikant. Lediglich bei einer Heminkonzentration von 0,05 mg/ml konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den SNP-Genotypen TT und AA ( $p=0,049$ ) ermittelt werden (weitere Werte: 0,0001 mg/ml  $p=0,142$ ; 0,0050mg/ml  $p=0,058$ ; 0,5 mg/ml  $p=0,079$ ). Dies kann auf die geringe Anzahl von Probanden ( $n=16$ ) zurückgeführt werden. Die stärkste Induktion der HMOX1 mRNA-Expression in Probanden mit dem TT Genotyp ist besonders interessant, da unter den Patienten der größeren Kohorte bei Sponholz et al. diese über die geringste Mortalitätsrate verfügen. So kann man die Hypothese aufstellen, dass ein erhöhtes Induktionspotenzial und damit eine erhöhte

## 4. Ergebnisse

Reservekapazität eine protektive Wirkung auf den Outcome der Patienten hat.

Um die Proteinebene nicht zu vernachlässigen, wurde ein ELISA zur Quantifizierung des HO-1 Proteingehaltes durchgeführt. Dabei kam es zu keinerlei signifikanten Ergebnissen. Dies könnte mit der Messmethodik des ELISAs zusammenhängen. Die photometrische Messung könnte mit den erhöhten Heminkonzentrationen interagiert haben. Es könnte natürlich auch eine Degradierung des HO-1 Proteins durch die erhöhte Heminkonzentration stattgefunden haben. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass ab einer Heminkonzentration von 0,05 mg/ml ein veränderter Kurvenverlauf sichtbar wird, bei dem die HO-1 Proteinkonzentration aller drei Genotypen abnimmt (Abb.15).

### 4.6. Bilirubinstimulation

In den vorliegenden Daten wurden Hinweise auf eine mögliche Induktion der mRNA-Expression der Hämoxygenase-1 durch Bilirubin gefunden. Dies war zum Zeitpunkt der experimentellen Arbeiten lediglich bei Jansen et al. 2010 als Hypothese erwähnt, jedoch nicht mit Daten unterlegt worden. So wurde eine in-vitro Bilirubinstimulation bei 4 freiwilligen Probanden durchgeführt, um diese Hypothese zu überprüfen.

#### 4. Ergebnisse

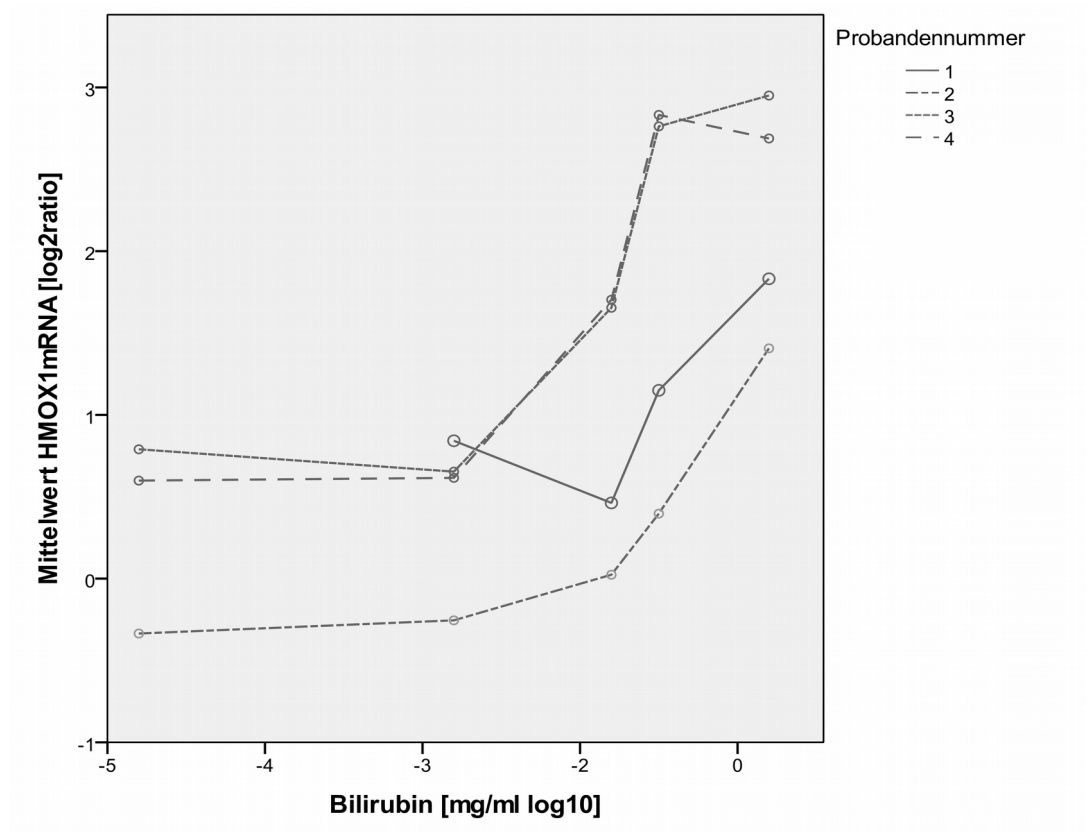


Abb.16 **HMOX-1 mRNA-Expression in Abhängigkeit von der Bilirubinkonzentration.** Hierbei steht jeder Strich für den interpolierten individuellen Verlauf.

Dabei konnte ein signifikanter Einfluss der Bilirubinkonzentration auf den Verlauf der mRNA-Expression ermittelt werden ( $p=0,041$ ). Besonders mit Überschreiten des physiologischen Bereiches der Bilirubinkonzentration konnte eine erhöhte HMOX-1 mRNA-Expression festgestellt werden (Abb.16). Insofern kann die Hypothese der Induktion der Hämoxygenase mRNA-Expression durch das Endprodukt des von ihr katalysierten Stoffwechselweges aufgestellt werden.

## 5. Diskussion

### **5. Diskussion**

Im translationalen Ansatz untersuchten wir die rs2071746 Genotypen, die mRNA Expression der zirkulierenden Leukozyten sowie die Proteinexpression der Hämoxygenase-1 von initial 50 Patienten mit schwerer Sepsis, septischem Schock und Multiorganversagen und 16 gesunden Freiwilligen ähnlicher Alterszusammensetzung. Ziel war es, den Einfluss des Stoffwechselweges des Hämabbaues bei schwerer Sepsis, septischem Schock und Multiorganversagen näher zu charakterisieren. Als Endprodukt höherer Ordnung und Routineparameter auf Intensivstation wurde das Gesamtbilirubin untersucht. Ebenfalls betrachteten wir die Biliverdinreduktasen A und B als konsekutive Enzyme im Stoffwechselweg. Zur Schaffung kontrollierter Bedingungen erfolgten ex-vivo Stimulationsexperimente mit Hemin und Bilirubin. Hierbei konnte der Einfluss der Genotypen beziehungsweise des Bilirubins auf die mRNA und Proteinexpression der Hämoxygenase-1 genauer beschrieben werden. Als stressrelevante Transkripte und beschriebene Inflamationsmarker analysierten wir die S100A8 und S100A12 mRNA-Expression der zirkulierenden Leukozyten, um eine nähere Patientencharakterisierung zu ermöglichen (Payen et al. 2008). Selbstverständlich wurde die Kohorte auch hinsichtlich der Schwere des Organversagens (SOFA Score) untersucht. Die Einschlusskriterien wurden breit gehalten, um eine möglichst repräsentative Kohorte von Sepsispatienten, die in dieser Zeit auf den Intensivstationen des Universitätsklinikums Jena behandelt wurden, abbilden zu können. Um nicht nur eine Momentaufnahme, sondern eine zuverlässige Charakterisierung des Krankheitsverlaufes zu gewährleisten, wurden standardisiert an 5 Tagen Proben entnommen (Tag 1, Tag 3, Tag 5, Tag 7 des Aufenthaltes auf Intensivstation und sofern möglich nach Sepsis). Dieser longitudinale Ansatz ermöglichte eine umfassendere Betrachtung des jeweiligen Werteverlaufes. Zur Analyse der Proben fanden etablierte Standardverfahren wie die qPCR zur mRNA-Expressionsanalyse und ein kommerziell erhältlicher HO-1 ELISA zur Proteinexpressionsbestimmung Anwendung. Dies gewährleistet eine erhöhte Zuverlässigkeit der erhobenen Daten.

#### **5.1. Charakterisierung der Patientenkohorte mittels SOFA Score**

Zur Charakterisierung der Patientenkohorte wählten wir den SOFA Score, der routinemäßig auf Intensivstation erhoben wurde, aus. Dieser ist ein bewährter Parameter, um das Ausmaß des Organversagens zu charakterisieren und den Schweregrad der Sepsis einschätzen zu können



## 5. Diskussion

(Minne et al. 2008). Ebenfalls zeigte der SOFA Score in Untersuchungen vergleichbare Werte zum APACHE II und SAPS II Score im Hinblick auf die Prognose der Überlebenswahrscheinlichkeit. Allerdings wird der Kombination des SOFA Scores mit dem APACHE II oder SAPS II Score eine noch bessere Voraussage der Überlebenswahrscheinlichkeit attestiert (Minne et al. 2008). In die Berechnung des SOFAS Scores findet der Bilirubinwert ebenfalls Eingang. Um einer möglichen Ergebnisverfälschung vorzubeugen, verwendeten wir diesen ausschließlich zur Beschreibung der Kohorte und die 28 Tage Mortalität als Diskriminations- und Outcomeparameter.

Hier konnte ab Tag 3 eine deutliche Unterscheidung zwischen später überlebenden und verstorbenen Patienten anhand des SOFA Scores aufgezeigt werden. Auch zeigte die 28-Tage Mortalität einen signifikanten Einfluss auf den Verlauf des SOFA Scores. Eine Unterscheidung von später Überlebenden und Verstorbenen war ebenfalls anhand des relativen Wertes zu Tag 1 (deltaSOFAScore) möglich. Dies bestätigt das gute Diskriminationspotential des SOFA Scores und die hinreichende Repräsentation beider Subgruppen des Überlebensstatus in der Patientenkohorte.

### 5.2. Analyse der stressrelevanten Transkripte S100A8 und S100A12

Als weitere potentielle Sepsismarker untersuchten wir die mRNA-Expression der Proteine S100A8 und S100A12. Diese waren zuvor als mögliche Sepsismarker in Bezug auf den Regenerationsprozess beschrieben worden (Payen et al. 2008). Dabei wurde bei Payen et al. vor allem die Entwicklung der mRNA Expression in Bezug auf Tag 0 als Parameter verwendet. Diese zeigte sich bei S100A8 und S100A12, wie bereits durch Payen et al. beschrieben, als abnehmend. Teilweise war sogar eine Unterscheidung zwischen später überlebenden und verstorbenen Patienten möglich. Es war rein deskriptiv eine erhöhte Expression bei den später verstorbenen Patienten im Vergleich zu den später überlebenden Patienten zu allen Abnahmezeitpunkten feststellbar. Während bei beiden Gruppen eine Abnahme der Expression im Zeitverlauf zu verzeichnen war, war diese bei den später Überlebenden deutlich stärker ausgeprägt und ermöglichte teilweise sogar eine signifikante Unterscheidbarkeit dieser beiden Gruppen. Im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe waren beide Proteine bei Patienten signifikant induziert. Diese Erkenntnisse lassen sich mit der beschriebenen Hemmung des oxidativen Stoffwechsels der polymorphkernigen Neutrophilen (PMNs) durch Calprotectin, einem Proteinkomplex aus S100A8

## 5. Diskussion

und S100A9, gut in Einklang bringen. Bei Gabe von S100A8 an mit Lipopolysaccharid (LPS) behandelte Mäuse zeigten sich weniger oxidative Schäden, weniger histologische Schäden und auch eine geringere PMN- Infiltration. Die Überlebensrate konnte fast verdoppelt werden. Dies spricht für einen antiinflammatorischen, antioxidativen und somit protektiven Effekt von S100A8 bei Sepsis (Sun et al. 2013). Einschränkend muss natürlich die Vergleichbarkeit einer LPS induzierten Endotoxinämie bei Mäusen mit einer Sepsis bei Menschen angeführt werden.

Das Expressionsniveau beider Transkripte war bei den Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant induziert, was auf eine potentielle Bedeutung der Proteine im Rahmen der Sepsis hinweist. Die später verstorbenen Patienten hatten die absolut höheren Expressionswerte. Dies spricht einerseits für eine Beschränkung der protektiven Funktion auf einen gewissen Expressionsbereich, könnte andererseits aber auch ein Ausdruck der Schwere der Entzündungsreaktion sein, welche bei später verstorbenen Patienten als möglicherweise höher anzunehmen ist.

Auch S100A12 wird als potentieller Sepsismarker beschrieben. Es findet sich vor allem in neutrophilen Granulozyten, aber auch in Monozyten und Leukozyten. Im Rahmen inflammatorischer Prozesse wie einer Sepsis wird eine erhöhte Konzentration von S100A12 vor allem am primären Ort der Infektion, aber auch systemisch im Plasma beschrieben (Ahouiti et al. 2013). Durch Interaktion mit seinem Rezeptor RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts) aktiviert es den nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- $\kappa$ B) und induziert damit die Produktion von TNFalpha (tumor necrosis factor alpha) und Interleukin-6 (IL-6) und wirkt somit proinflammatorisch (Kikkawa et al. 2010). Durch den löslichen sRAGE Rezeptor kann S100A12 potentiell inhibiert werden. Damit gilt es als möglicher Ansatzpunkt um die Entzündungsreaktion einzudämmen (Ahouiti et al. 2013).

Auf der anderen Seite wird S100A12 zusammen mit dem S100A8/9 Komplex als möglicher damage associated molecular pattern (DAMP) angesehen (van Zoelen et al. 2011). Diese Stoffe sollen den Körper vor möglichen Gefahren schützen, indem sie proinflammatorische Effekte bewirken. Natürlich kann dies auch schädigend auf den Organismus einwirken. Es scheint daher ein interessanter Forschungsansatz zu sein, die Bedeutung dieser Proteine und ihren potentiellen therapeutischen Nutzens im Rahmen der Sepsis näher zu beleuchten. Dafür wären Bestimmungen der tatsächlichen Aktivität der beiden Proteine ein wichtiger Aspekt.

### 5.3. HO-1 Proteinexpression in Sepsispatienten

Besonderer Fokus der vorliegenden Arbeit war die funktionelle Charakterisierung des Hämabbaus in Patienten mit Sepsis. Dabei stellt die Hämoxygenase den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar (Tenhunen et al. 1968).

Die Hämoxygenase-1 gilt als ein entscheidendes Enzym im Rahmen der systemischen Stressantwort (Wegiel et al. 2013, Saukkonen et al. 2010). So zeigte sich die Proteinkonzentration der Hämoxygenase-1 in Patienten mit Sepsis gegenüber der Kontrollgruppe deutlich gesteigert (Abb.10). Dies konnte in der größeren Studienkohorte mit 42 zusätzlichen Patienten bestätigt werden (Sponholz et al. 2012). Im Einklang damit konnten andere Forschergruppen bei kritisch kranken Patienten ebenfalls eine signifikante Erhöhung der HO-1 Plasmakonzentration gegenüber der gesunden Kontrollgruppe nachweisen (Saukkonen et al. 2010).

Eine signifikante Unterscheidung zwischen später Überlebenden und Verstorbenen ist an den ersten drei Messzeitpunkten möglich. Dabei ist die Konzentration des HO-1 Proteins bei den später Verstorbenen im Vergleich zu den Überlebenden erhöht. Dies steht im Kontrast zur Untersuchung von Saukkonen et al., bei der keine Unterscheidung zwischen Überlebenden und Verstorbenen möglich war. Dabei muss berücksichtigt werden, dass bei Saukkonen die Krankenhaussterblichkeit im Gegensatz zur 28-Tage-Mortalität betrachtet wurde (Saukkonen et al. 2010). Bei der Verwendung der Sterblichkeit auf Intensivstation als Outcomeparameter konnte auch in unserer Studie keine Unterscheidung zwischen später Überlebenden und Verstorbenen getroffen werden (Abb. 18 Anhang). Eine Analyse der Daten von Saukkonen unter Berücksichtigung der 28- Tage-Mortalität wäre sicherlich aufschlussreich. So wäre es spannend, die Daten auf noch längerfristige Outcomeparameter wie die 90-Tage-Mortalität hin zu analysieren. Die Unterscheidungsmöglichkeit von Überlebenden und Verstorbenen in Hinblick auf die längerfristige Outcomeprognose ist besonders interessant, da ein langfristigerer Effekt der HO-1 Konzentration auf den Krankheitsverlauf möglich und somit eine Verwendung als Prognoseparameter denkbar wäre.

Eine Erhöhung des arteriellen CO Gehaltes, des Bilirubin-Levels und der monozytischen HO-1 Konzentration bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischen Schock im Vergleich zu nicht-septischen Patienten auf Intensivstation wurde von Takaki et al. festgestellt (Takaki et al. 2010). Außerdem postulierte diese Forschergruppe eine positive Korrelation zwischen Überleben und

## 5. Diskussion

erhöhter HO-1 Expression und hohen CO- Leveln. Dies steht im scheinbaren Gegensatz zu den hier erhobenen Daten, die eine erhöhte HO-1 Expression bei den verstorbenen Patienten ergaben. Dabei muss berücksichtigt werden, dass Takaki et al. die intrazelluläre HO-1 Expression peripherer monozytischer Zellen im Gegensatz zur HO-1 Expression im Serum ermittelten. Eine Untersuchung, die beide Werte berücksichtigen würde, wäre dabei sicherlich aufschlussreich und könnte Hinweise über die Herkunft des Hämoxxygenase-1 Proteins im Serum beziehungsweise Plasma geben. Hierbei wäre eine Analyse im Hinblick auf die Aktivität und nicht alleinige Proteinkonzentration des Enzyms unerlässlich, da die Proteinkonzentration auch durch andere Einflüsse, wie beispielsweise den erhöhten Zellzerfall oder Hypoxie beeinflussbar ist (Karovic et al. 2007, Saukkonen et al. 2010, Sponholz et al. 2012). Gerade die scheinbare Paradoxie zwischen potentieller protektiver Funktion der Hämoxxygenase-1 und erhöhtem Anfall des Proteins bei Zellzerfall macht eine Bewertung der Bedeutung der HO-1 Proteinkonzentration besonders schwierig. Die Betrachtung der verschiedenen Zellkompartimente wie Leberzellen oder monozytische Zellen gemeinsam mit dem Gesamtplasmagehalt sind daher besonders interessant, um diese Ambiguität widerzuspiegeln und bewerten zu können.

In der vorliegenden Kohorte zeigte die Mortalität einen Einfluss auf den Zeitverlauf des Parameters HO-1-Proteinkonzentration. Dies könnte im Rahmen der Risikostratifizierung von Sepsiserkrankten einen neuen Aspekt darstellen. Zusammenfassend sprechen die vorliegenden Ergebnisse für eine Bedeutung der Hämoxxygenase-1 im Rahmen des Krankheitsbildes Sepsis. Beispielsweise könnte dies auf die Funktion der Hämoxxygenase-1 als induziertes Gen im Rahmen der Stressantwort des Körpers zurückzuführen sein (Wegiel et al. 2013). Dabei bleibt zu diskutieren, ob eine Steigerung der Hämoxxygenase-1 positive oder negative Einflüsse auf den Verlauf der Sepsis hat. Einerseits wird von der protektiven Rolle der Hämoxxygenase-1 bei beispielsweise vaskulären Erkrankungen berichtet, andererseits scheint diese wiederum auf einen eng gesteckten Bereich der Expression beschränkt zu sein (Grochot-Przeczek et al. 2012, Bauer et al. 2008). Gerade neuere Studien zum Thema Hämoxxygenase-1 bei Diabetes werfen dabei neue Fragen hinsichtlich des antiinflammatorischen Potentials der Hämoxxygenase-1 auf. So wurde eine Erhöhung der Hämoxxygenase-1 bei adipösen Menschen mit Begleiterkrankungen gefunden, und eine Deletion der Hämoxxygenase-1 bei Mäusen hatte eine protektive Funktion im Hinblick auf Folgeerkrankungen wie Fettleber und Lebertoxizität (Jais et al. 2014). Diese kontrovers diskutierte

## 5. Diskussion

Studie stellt somit das Konzept der protektiven Funktion der Hämoxxygenase-1 grundsätzlich in Frage. Sicherlich ist es dabei wichtig, die einzelnen Krankheitsentitäten wie Sepsis und Diabetes voneinander getrennt zu betrachten.

### 5.4. Expressionsverhalten der Hämoxxygenase-1 unter Einfluss des rs2071746 SNP Genotyps

Um neben der Proteinebene auch das Expressionsverhalten der Hämoxxygenase-1 näher zu analysieren, untersuchten wir auch den Zusammenhang des Überlebensstatus der Patienten mit der HMOX1 mRNA-Expression. Interessanterweise konnten wir dabei keinen Einfluss nachweisen. Dies scheint durch potentiell unterschiedliche Regulationsmechanismen auf Protein- und mRNA-Ebene durchaus plausibel zu sein. Ein Aspekt sind dabei verschiedene genetische Polymorphismen, die einen Einfluss auf die Expression der Hämoxxygenase-1 haben. Im Speziellen fokussierten wir auf den rs2071746 SNP Genotyp, der bereits in verschiedenen Studien einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf gezeigt hatte (siehe Kapitel 1.3.). Um den Einfluss des Genotypes unter kontrollierten Bedingungen untersuchen zu können, wurde eine ex-vivo Heminstimulation an 16 freiwilligen Probanden durchgeführt. Hierbei konnte eine Interaktion der Heminkonzentration mit dem Genotyp nachgewiesen werden. Beim Genotyp TT zeigte sich hierbei die stärkste Induktion der Hämoxxygenase-1 auf mRNA-Ebene. Im Gegensatz dazu konnten in anderen Studien die niedrigsten HO-1 Plasma Konzentrationen beim TT-Genotyp nachgewiesen werden, allerdings waren diese Ergebnisse nur teilweise signifikant (Sheu et al. 2009, Saukkonen et al. 2010). Auf Proteinebene konnte kein Einfluss des rs2071746-Genotypes nachgewiesen werden. Dieser fehlende Effekt auf Proteinebene ist am ehesten auf die verwendete Messmethodik der Absorbanzmessung des HO-1 ELISA und eine möglichen Interaktion dieser mit der steigenden Heminkonzentration zurückzuführen. Schon makroskopisch war eine Dunkelverfärbung des vermessenen Plasmas mit steigender Heminkonzentration sichtbar. So folgten anfänglich steigenden Proteinkonzentrationen bei steigender Heminkonzentration bei noch höheren Heminkonzentrationen sehr variable Werte (Abb.15). Eine Modifikation der Messmethodik wäre notwendig, um die tatsächliche Proteinplasmakonzentration zu bestimmen.

Ebenfalls widmeten wir uns der Frage des Zusammenhanges zwischen den Genotypen der Sepsispatienten und deren Überleben. Dabei konnten wir keine signifikanten Ergebnisse erzielen. Zwar war rein deskriptiv eine höhere Mortalitätsrate beim heterozygotem AT Genotyp zu

## 5. Diskussion

beobachten. Dies steht jedoch im Gegensatz zur größeren Studienpopulation von Sponholz et al., bei der bereits das Vorhandensein eines A-Alleles einen negativen Einfluss auf den Outcome der Patienten hatte. Auch dort konnte kein Zusammenhang zwischen der Höhe der HO-1 Plasmakonzentration und einem bestimmten rs2071746 Genotyp ermittelt werden (Mayr et al. 2014, Sponholz et al. 2012). Dies ist sicherlich mit der geringeren Anzahl unserer als Stichprobenanalyse angelegten Studie zu erklären. Für eine aussagekräftige populationsbasierte Studie wäre eine deutlich höhere Anzahl von Patienten notwendig, was jedoch auch nicht das Ziel unserer als explorativen Analyse konzipierten Untersuchung darstellte.

### 5.5. Die Bilirubinreduktasen A und B und ihr Produkt Bilirubin

Neben der Charakterisierung des geschwindigkeitsbestimmendes Enzymes wählten wir den Parameter Gesamtbilirubin als entstehendes Produkt des Hämabbaues aus. Dabei konnte eine relative Erhöhung des Gesamtbilirubins nachgewiesen werden. Bei den später Verstorbenen (28 Tage) zeigten sich ab dem zweiten Abnahmezeitpunkt rein deskriptiv höhere Werte als bei den Überlebenden. Einschränkend muss dabei natürlich berücksichtigt werden, dass Bilirubin auch im Rahmen einer Leberschädigung durch die Sepsis erhöht sein kann (Bauer et al. 2013, Kobashi et al. 2013).

Im Verlauf der Untersuchungen ergaben sich Hinweise auf eine mögliche Rückkopplung von Bilirubin auf die mRNA-Expression der Hämoxxygenase-1. Daher führten wir an vier freiwilligen Probanden eine ex-vivo Bilirubinstimulation durch. Hierbei konnte eine deutliche Induktion der HMOX1-mRNA durch Bilirubin nachgewiesen werden. Dies würde eine Induktion des Enzyms durch sein Abbauprodukt höherer Ordnung (Bilirubin) bedeuten. Ein anderer Aspekt ist die Induktion von oxidativem Stress durch Bilirubin, die konsekutiv zu einer Erhöhung der HMOX1-mRNA Expression beigetragen haben könnte (Qaisiya et al. 2014). Bisher wurde eine solche Rückkoppelung lediglich erwähnt, beziehungsweise anhand einer Neuroblastomzelllinie bestätigt, konkrete experimentelle Daten auf ex-vivo Ebene liegen hier erstmals vor (Jansen et al. 2010).

Bilirubin entsteht durch die Reduktion des von der Hämoxxygenase-1 produzierten Biliverdins zu Bilirubin (Tenhunen et al. 1970). Konsequenterweise analysierten wir daher auch die Expression der Biliverdinreduktasen A und B. Erstaunlicherweise war die Expression der Biliverdinreduktasen

## 5. Diskussion

A und B auf mRNA-Ebene in den Patienten nicht erhöht. Sie war im Vergleich zur Kontrollgruppe an den ersten beiden Abnahmezeitpunkten sogar signifikant vermindert (Abb. 12A, 13A). Auch zeigten beide Isoenzyme unterschiedliche Eigenschaften. So wiesen bei der Biliverdinreduktase A die Verstorbenen höhere Werte auf als die Überlebenden. Bei der Biliverdinreduktase B verhielt es sich genau entgegengesetzt. Dies ist sicherlich aber auch mit der geringeren Probandenzahl bei der Bilirubinreduktase A Messung erklärbar. Ein interessanter Aspekt wäre es natürlich, die Proteinkonzentration beziehungsweise die Aktivität des Enzyms näher zu charakterisieren, um unterschiedliche Regulationsmechanismen auf verschiedenen Expressionsebenen, wie oben bei der Hämoxygenase-1 näher beschrieben, identifizieren zu können.

### 5.6. Schlussfolgerungen

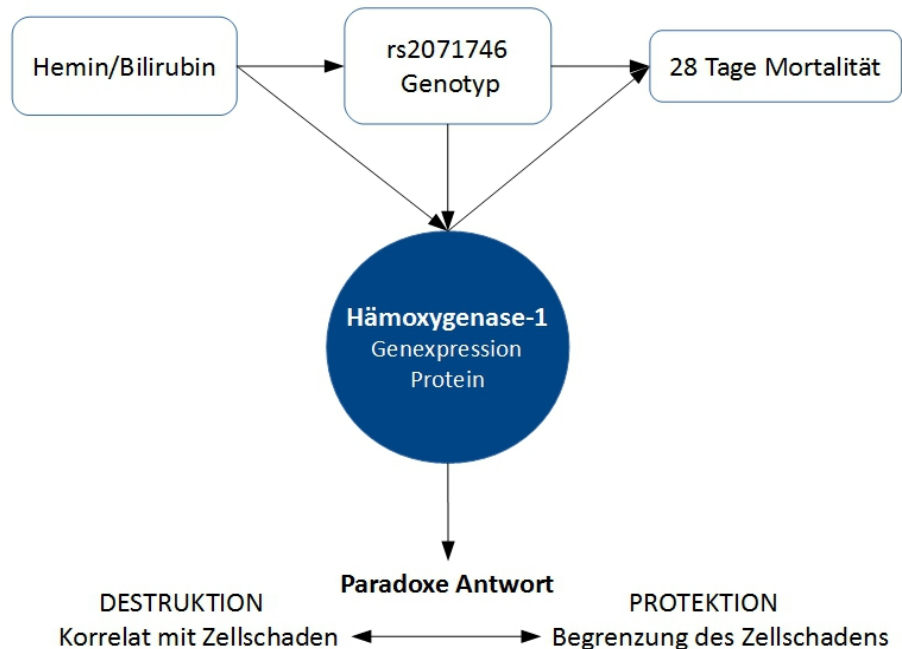


Abb.17 **Einflussfaktoren und Zielgrößen des Expressionsverhaltens der Hämoxxygenase-1.** Dabei wurden die Interaktionen zwischen der 28 Tage Mortalität, dem rs2071746 Genotyp und der resultierenden Gen- und Proteinexpression der Hämoxxygenase-1 untersucht. Auch wurde der Einfluss einer Stimulation mit Hemin und Bilirubin auf diese Faktoren näher beleuchtet. Dabei muss die Zweiseitigkeit des Anstiegs der Hämoxxygenase-1, einmal in Korrelation mit dem Zellschaden und andererseits als zellprotektives Enzym zur Begrenzung eben dieses Schadens besonders beachtet werden.

Der Fragestellung bezüglich der Rolle des Hämabbaues in Patienten mit schwerer Sepsis, septischem Schock und Multiorganversagen näherten wir uns im translationalen Ansatz mit der longitudinalen Untersuchung von 50 Patienten und dem Vergleich zu 16 gesunden Freiwilligen mit ähnlicher Alterszusammensetzung. Dabei war die HO-1 Proteinkonzentration zu allen Zeitpunkten bei den Patienten gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Auch war teilweise eine Unterscheidung zwischen nach 28-Tage überlebenden und verstorbenen Patienten möglich. Dies ist besonders interessant, da dies bei der Berücksichtigung der Sterblichkeit auf Intensivstation nicht möglich war und deutet gerade auf einen längerfristigen Effekt der Hämoxxygenase-1 im Rahmen der Sepsis hin. Dies könnte eine frühzeitige Identifizierung von Risikopatienten mit



## 5. Diskussion

entsprechender Optimierung der Therapie ermöglichen.

Der deskriptive Befund, dass die Werte der später verstorbenen Patienten höher als die der Überlebenden waren, stellt dabei die Rolle des Hämoxxygenase-1 auf den Prüfstand. Zuvor schon wurde über die Protektivität beziehungsweise Schädlichkeit der Hämoxxygenase-1 diskutiert. Auch die These eines gewissen protektiven Expressionsbereiches steht im Raum (Bauer et al. 2008). Gerade eine neuere Studie bei übergewichtigen Patienten hat dieses Thema erneut in den Brennpunkt gerückt und postuliert die Schädlichkeit der Hämoxxygenase-1 bei Diabetes-2 (Jais et al. 2014). In diesem Zusammenhang bildet unsere Studie einen wichtigen Beitrag um der tatsächlichen Rolle der Hämoxxygenase-1 in Patienten mit schwerer Sepsis näher zu kommen und stellt ein Argument für einen zumindest in gewissen Bereichen möglicherweise schädlichen Einfluss der Hämoxxygenase-1 dar. (Abb.17)

Ein weiteres betrachtenswertes Resultat unserer Studie ist die Untersuchung der Inflammationsmarker S100A8 und S100A12 bei Patienten mit Sepsis. Dort waren die mRNA-Expressionen beider Transkripte in Patienten gegenüber Kontrollen deutlich induziert. Auch war eine teilweise Unterscheidung zwischen nach 28-Tagen überlebenden und verstorbenen Patienten möglich. Die Rolle dieser beiden Proteine bei der Sepsis ist bisher noch wenig erforscht und bietet einen interessanten Ansatz, um eine Risikostratifizierung der Patienten vorzunehmen. Auch hier war wie bei der HO-1 Proteinexpression deskriptiv eine Erhöhung der mRNA-Expression bei den später Verstorbenen gegenüber den Überlebenden zu verzeichnen und stellt einen denkbaren Therapieansatz dar. Durch die selektive Inhibierung des S100A12 Proteins durch den sRAGE Rezeptor scheint diese Möglichkeit zumindest denkbar (Ahouiti et al. 2013). Sicherlich müsste dazu noch eine nähere Charakterisierung dieser Transkripte auf Protein und Aktivitätsebene erfolgen, um die Resultate zu verifizieren und die tatsächliche Rolle von S100A8 und S100A12 bei der Sepsis zu verstehen.

Zusammenfassend bietet die vorliegende Studie neue Ansatzpunkte, um eine bessere Risikostratifizierung und damit Optimierung der Therapie von Patienten mit schwerer Sepsis, septischem Schock und Multiorganversagen zu ermöglichen und stellt somit einen Beitrag zum näheren Verständnis des immer noch mit hoher Letalität assoziierten Krankheitsbildes Sepsis dar (Mayr et al. 2014).

## 6. Anhang

### 6. Anhang

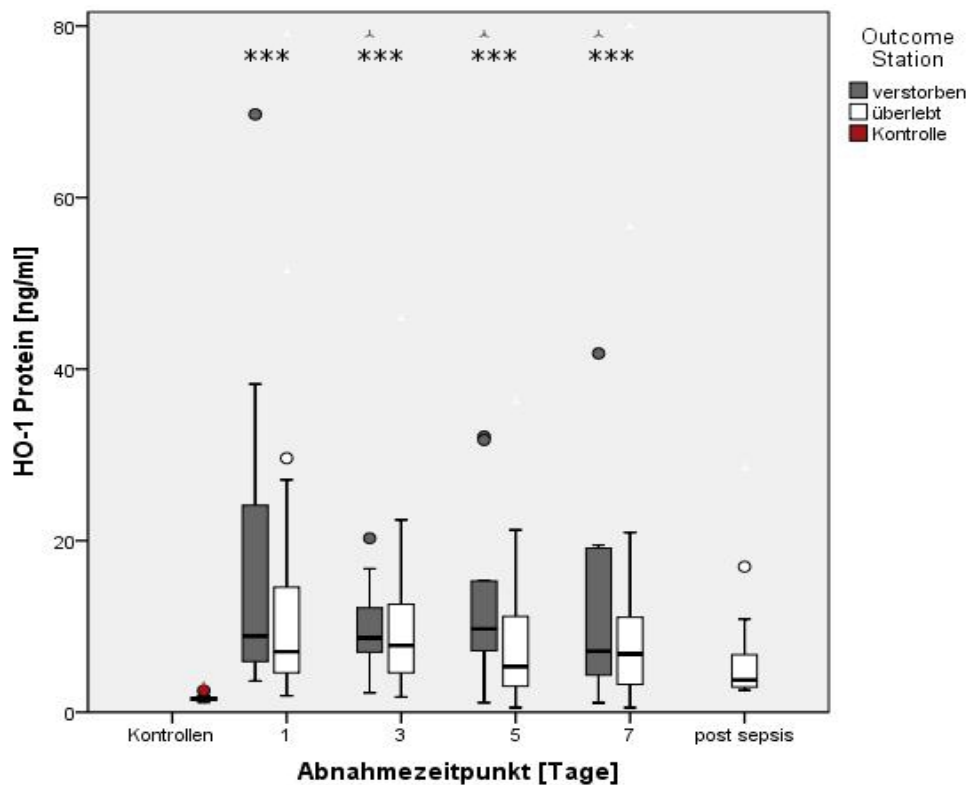


Abb.18: **HO-1 Proteinkonzentration im Zeitverlauf stratifiziert nach 28-Tage Mortalität.** Hierbei stehen \* für die Unterscheidung zwischen Kontrollen und Patienten (\*\* $p < 0,001$ ).

Tab. 11 **Sepsiskriterien** nach der Leitlinie der deutschen Sepsisgesellschaft von 2010

Folgende Kriterien sind zur Diagnosestellung der Sepsis festgelegt worden:

I. Nachweis der Infektion
Diagnose einer Infektion über den mikrobiologischen Nachweis oder durch klinische Kriterien
II. Systemic inflammatory host response (SIRS)(mind. 2 Kriterien)
<ul style="list-style-type: none"> <li>– Fieber (<math>\geq 38^{\circ}\text{C}</math>) oder Hypothermie (<math>\leq 36^{\circ}\text{C}</math>) bestätigt durch eine rektale oder intravasale oder – vesikale Messung</li> <li>– Tachykardie: Herzfrequenz <math>\geq 90</math> /min</li> <li>– Tachypnoe (Frequenz <math>\geq 20</math>/min) o. Hyperventilation (<math>\text{PaCO}_2 \leq 4.3</math> kPa/ <math>\leq 33</math> mmHg)</li> <li>– Leukozytose (<math>\geq 12000/\text{mm}^3</math>) oder Leukopenie (<math>\leq 4000/\text{mm}^3</math>) oder <math>\geq 10\%</math> unreife Neutrophile im Differentialblutbild</li> </ul>
III. Akute Organdysfunktion (mind. 1 Kriterium)
<ul style="list-style-type: none"> <li>– Akute Enzephalopathie: eingeschränkte Vigilanz, Desorientiertheit, Unruhe, Delirium.</li> <li>– Relative oder absolute Thrombozytopenie: Abfall der Thrombozyten um mehr als 30% innerhalb von 24 Stunden oder Thrombozytenzahl <math>\leq 100.000/\text{mm}^3</math>. Eine Thrombozytopenie durch akute Blutung oder immunologische Ursachen muss ausgeschlossen sein.</li> </ul>

## 6. Anhang

- Arterielle Hypoxämie:  $\text{PaO}_2 \leq 10 \text{ kPa}$  ( $\leq 75 \text{ mmHg}$ ) unter Raumluft oder ein  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Verhältnis von  $\leq 33 \text{ kPa}$  ( $\leq 250 \text{ mmHg}$ ) unter Sauerstoffapplikation. Eine manifeste Herz- oder Lungenerkrankung muss als Ursache der Hypoxämie ausgeschlossen sein.
- Renale Dysfunktion: Eine Diurese von  $\leq 0.5 \text{ ml/kg/h}$  für wenigstens 2 Stunden trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder ein Anstieg des Serumkreatinins  $> 2\times$  oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches.
- Metabolische Azidose: Base Excess  $\leq -5 \text{ mmol/l}$  oder eine Laktatkonzentration  $> 1,5\times$  oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches.

Sepsis: Kriterien I und II,

Schwere Sepsis: Kriterien I, II und III

Septischer Schock: Kriterien I und II sowie für wenigstens 1 Stunde ein systolischer arterieller Blutdruck  $\leq 90 \text{ mmHg}$  bzw. ein mittlerer arterieller Blutdruck  $\leq 65 \text{ mmHg}$  oder notwendiger Vasopressoreinsatz, um den systolischen arteriellen Blutdruck  $\geq 90 \text{ mmHg}$  oder den arteriellen Mitteldruck  $\geq 65 \text{ mmHg}$  zu halten. Die Hypotonie besteht trotz adäquater Volumengabe und ist nicht durch andere Ursachen zu erklären.

### **Danksagung**

Um eine solche Arbeit fertigzustellen, ist eine Unterstützung durch viele engagierte Menschen unschätzbar wichtig. Daher möchte ich zuallererst PD Dr. Claus für seine intensive, kontinuierliche, konstruktive, immer wieder motivierende und geduldige Unterstützung in allen Bereichen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, Danke sagen. Prof. M. Bauer danke ich ebenfalls sehr für die Überlassung des Themas, die konzeptionelle Unterstützung und gute Betreuung. Dem IZKF in Jena danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit durch das Promotionsstipendium.

Weiterhin danke ich Jaqueline Fischer, Brigitte Specht, und Edith Walter für die praktische Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten. Außerdem danke ich Dr. Sponholz für die Hilfe. Auch bei Dr.med. G.Otto möchte ich mich bedanken. Für die geduldige Hilfe in statistischen Fragen gilt mein Dank außerdem Dr.rer.nat. M.Walther. Neben dieser fachlichen Unterstützung möchte ich mich bei meinem Verlobten André Bastick für die seelische Unterstützung und das mehrmalige Korrekturlesen bedanken.

Und nicht zuletzt möchte ich ganz besonders meinen Eltern für Ihre Unterstützung in allen Feldern und den nie abgerissenen Geduldsfaden danken.

### **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,  
ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,  
mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. M. Bauer, PD Dr. rer. nat. R. Claus, Dr. med. C. Sponholz, Dr. med. G. Otto, Dr. rer. nat. M. Walther,  
die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,  
dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und  
dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 30.01.2016

**7. Literatur- und Quellenverzeichnis**

- Abbas AK, Murphy KM, Sher A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383 (6603):787-793.
- Abraham E, Singer M. 2007. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med*, 35 (10):2408-2416.
- Abraham E, Wunderink R, Silverman H, Perl TM, Nasraway S, Levy H, Bone R, Wenzel RP, Balk R, Allred R, et al. 1995. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group. *JAMA*, 273 (12):934-941.
- Abraham NG, Kappas A. 2008. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev*, 60 (1):79-127.
- Achouiti A, Foll D, Vogl T, van Till JW, Laterre PF, Dugernier T, Wittebole X, Boermeester MA, Roth J, van der Poll T, van Zoelen MA. 2013. S100A12 and soluble receptor for advanced glycation end products levels during human severe sepsis. *Shock*, 40 (3):188-194.
- Angus DC. 2011. The search for effective therapy for sepsis: back to the drawing board? *JAMA*, 306 (23):2614-2615.
- Balla J, Vercellotti GM, Jeney V, Yachie A, Varga Z, Eaton JW, Balla G. 2005. Heme, heme oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Mol Nutr Food Res*, 49 (11):1030-1043.
- Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. 2002. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (25):16093-16098.
- Barker RN, Erwig L, Pearce WP, Devine A, Rees AJ. 1999. Differential effects of necrotic or apoptotic cell uptake on antigen presentation by macrophages. *Pathobiology*, 67 (5-6):302-305.
- Basu S, Eriksson M. 1998. Oxidative injury and survival during endotoxemia. *FEBS Lett*, 438 (3):159-160.
- Bauer M, Press AT, Trauner M. 2013. The liver in sepsis: patterns of response and injury. *Curr Opin Crit Care*, 19 (2):123-127.
- Bauer M, Huse K, Settmacher U, Claus RA. 2008. The heme oxygenase-carbon monoxide system: regulation and role in stress response and organ failure. *Intensive Care Med*, 34 (4):640-648.
- Berger SP, Hunger M, Yard BA, Schnuelle P, Van Der Woude FJ. 2000. Dopamine induces the

## 7. Literatur- und Quellenverzeichnis

- expression of heme oxygenase-1 by human endothelial cells in vitro. *Kidney Int*, 58 (6):2314-2319.
- Bernard GR, Wheeler AP, Russell JA, Schein R, Summer WR, Steinberg KP, Fulkerson WJ, Wright PE, Christman BW, Dupont WD, Higgins SB, Swindell BB. 1997. The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. The Ibuprofen in Sepsis Study Group. *N Engl J Med*, 336 (13):912-918.
- Bharucha AE, Kulkarni A, Choi KM, Camilleri M, Lempke M, Brunn GJ, Gibbons SJ, Zinsmeister AR, Farrugia G. 2010. First-in-human study demonstrating pharmacological activation of heme oxygenase-1 in humans. *Clin Pharmacol Ther*, 87 (2):187-190.
- Bone RC, Fisher CJ, Jr., Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA. 1987. A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, 317 (11):653-658.
- Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, Bricker TL, Jarman SD, 2nd, Kreisel D, Krupnick AS, Srivastava A, Swanson PE, Green JM, Hotchkiss RS. 2011. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA*, 306 (23):2594-2605.
- Braggins PE, Trakshel GM, Kutty RK, Maines MD. 1986. Characterization of two heme oxygenase isoforms in rat spleen: comparison with the hematin-induced and constitutive isoforms of the liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 141 (2):528-533.
- Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, Davies NA, Cooper CE, Singer M. 2002. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet*, 360 (9328):219-223.
- Brunkhorst FM, Engel C, Bloos F, Meier-Hellmann A, Ragaller M, Weiler N, Moerer O, Gruendling M, Oppert M, Grond S, Olthoff D, Jaschinski U, John S, Rossaint R, Welte T, Schaefer M, Kern P, Kuhnt E, Kiehntopf M, Hartog C, Natanson C, Loeffler M, Reinhart K. 2008. Intensive insulin therapy and pentastarch resuscitation in severe sepsis. *N Engl J Med*, 358 (2):125-139.
- Buis CI, van der Steege G, Visser DS, Nolte IM, Hepkema BG, Nijsten M, Slooff MJ, Porte RJ. 2008. Heme oxygenase-1 genotype of the donor is associated with graft survival after liver transplantation. *Am J Transplant*, 8 (2):377-385.
- Chen YH, Chau LY, Lin MW, Chen LC, Yo MH, Chen JW, Lin SJ. 2004. Heme oxygenase-1 gene

## 7. Literatur- und Quellenverzeichnis

promotor microsatellite polymorphism is associated with angiographic restenosis after coronary stenting. *Eur Heart J*, 25 (1):39-47.

Cohen J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420 (6917):885-891.

Crawford DC, Nickerson DA. 2005. Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu Rev Med*, 56:303-320.

Debets JM, Kampmeijer R, van der Linden MP, Buurman WA, van der Linden CJ. 1989. Plasma tumor necrosis factor and mortality in critically ill septic patients. *Crit Care Med*, 17 (6):489-494.

Denisov V, Strong W, Walder M, Gingrich J, Wintz H. 2008. Development and validation of RQI: an RNA quality indicator for the Experion automated electrophoresis system. *Bio-Rad Bulletin*, 5761.

Exner M, Minar E, Wagner O, Schillinger M. 2004. The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. *Free Radic Biol Med*, 37 (8):1097-1104.

Faust SN, Heyderman RS, Levin M. 2001a. Coagulation in severe sepsis: a central role for thrombomodulin and activated protein C. *Crit Care Med*, 29 (7 Suppl):S62-67; discussion S67-68.

Faust SN, Levin M, Harrison OB, Goldin RD, Lockhart MS, Kondaveeti S, Laszik Z, Esmon CT, Heyderman RS. 2001b. Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis. *N Engl J Med*, 345 (6):408-416.

Ferreira FL, Bota DP, Bross A, Melot C, Vincent JL. 2001. Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. *JAMA*, 286 (14):1754-1758.

Ferris CD, Jaffrey SR, Sawa A, Takahashi M, Brady SD, Barrow RK, Tysoe SA, Wolosker H, Baranano DE, Dore S, Poss KD, Snyder SH. 1999. Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nat Cell Biol*, 1 (3):152-157.

Fisher CJ, Jr., Slotman GJ, Opal SM, Pribble JP, Bone RC, Emmanuel G, Ng D, Bloedow DC, Catalano MA. 1994. Initial evaluation of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of sepsis syndrome: a randomized, open-label, placebo-controlled multicenter trial. *Crit Care Med*, 22 (1):12-21.

Fisher CJ, Jr., Agosti JM, Opal SM, Lowry SF, Balk RA, Sadoff JC, Abraham E, Schein RM, Benjamin E. 1996. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein.



## 7. Literatur- und Quellenverzeichnis

- The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N Engl J Med*, 334 (26):1697-1702.
- Florczyk UM, Jozkowicz A, Dulak J. 2008. Biliverdin reductase: new features of an old enzyme and its potential therapeutic significance. *Pharmacol Rep*, 60 (1):38-48.
- Fujita T, Toda K, Karimova A, Yan SF, Naka Y, Yet SF, Pinsky DJ. 2001. Paradoxical rescue from ischemic lung injury by inhaled carbon monoxide driven by derepression of fibrinolysis. *Nat Med*, 7 (5):598-604.
- Girardin E, Grau GE, Dayer JM, Roux-Lombard P, Lambert PH. 1988. Tumor necrosis factor and interleukin-1 in the serum of children with severe infectious purpura. *N Engl J Med*, 319 (7):397-400.
- Grochot-Przeczek A, Dulak J, Jozkowicz A. 2012. Haem oxygenase-1: non-canonical roles in physiology and pathology. *Clin Sci (Lond)*, 122 (3):93-103.
- Hatherill M, Tibby SM, Turner C, Ratnavel N, Murdoch IA. 2000. Procalcitonin and cytokine levels: relationship to organ failure and mortality in pediatric septic shock. *Crit Care Med*, 28 (7):2591-2594.
- Hayashi S, Omata Y, Sakamoto H, Higashimoto Y, Hara T, Sagara Y, Noguchi M. 2004. Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene*, 336 (2):241-250.
- Hotchkiss RS, Karl IE. 2003. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*, 348 (2):138-150.
- Hotchkiss RS, Tinsley KW, Karl IE. 2003. Role of apoptotic cell death in sepsis. *Scand J Infect Dis*, 35 (9):585-592.
- Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. 2013. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis*, 13 (3):260-268.
- Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, Buchman TG, Karl IE. 1999. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med*, 27 (7):1230-1251.
- Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Grayson MH, Osborne DF, Wagner TH, Cobb JP, Coopersmith C, Karl IE. 2002. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol*, 168 (5):2493-2500.
- Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmieg RE, Jr., Hui JJ, Chang KC, Osborne DF, Freeman BD,

## 7. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Cobb JP, Buchman TG, Karl IE. 2001. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol*, 166 (11):6952-6963.
- Ishikawa K, Navab M, Leitinger N, Fogelman AM, Lusis AJ. 1997. Induction of heme oxygenase-1 inhibits the monocyte transmigration induced by mildly oxidized LDL. *J Clin Invest*, 100 (5):1209-1216.
- Jaeschke H, Smith CW. 1997. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J Leukoc Biol*, 61 (6):647-653.
- Jais A, Einwallner E, Sharif O, Gossens K, Lu TT, Soyal SM, Medgyesi D, Neureiter D, Paier-Pourani J, Dalgaard K, Duvigneau JC, Lindroos-Christensen J, Zapf TC, Amann S, Saluzzo S, Jantscher F, Stiedl P, Todoric J, Martins R, Oberkofler H, Muller S, Hauser-Kronberger C, Kenner L, Casanova E, Sutterluty-Fall H, Bilban M, Miller K, Kozlov AV, Krempler F, Knapp S, Lumeng CN, Patsch W, Wagner O, Pospisilik JA, Esterbauer H. 2014. Heme oxygenase-1 drives metaflammation and insulin resistance in mouse and man. *Cell*, 158 (1):25-40.
- Jansen T, Hortmann M, Oelze M, Opitz B, Steven S, Schell R, Knorr M, Karbach S, Schuhmacher S, Wenzel P, Munzel T, Daiber A. 2010. Conversion of biliverdin to bilirubin by biliverdin reductase contributes to endothelial cell protection by heme oxygenase-1-evidence for direct and indirect antioxidant actions of bilirubin. *J Mol Cell Cardiol*, 49 (2):186-195.
- Kaneda H, Ohno M, Taguchi J, Togo M, Hashimoto H, Ogasawara K, Aizawa T, Ishizaka N, Nagai R. 2002. Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with coronary artery disease in Japanese patients with coronary risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22 (10):1680-1685.
- Kapturczak MH, Wasserfall C, Brusko T, Campbell-Thompson M, Ellis TM, Atkinson MA, Agarwal A. 2004. Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse. *Am J Pathol*, 165 (3):1045-1053.
- Karovic O, Tonazzini I, Rebola N, Edstrom E, Lovdahl C, Fredholm BB, Dare E. 2007. Toxic effects of cobalt in primary cultures of mouse astrocytes. Similarities with hypoxia and role of HIF-1 $\alpha$ . *Biochem Pharmacol*, 73 (5):694-708.
- Katori M, Buelow R, Ke B, Ma J, Coito AJ, Iyer S, Southard D, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. 2002. Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway. *Transplantation*, 73 (2):287-292.

## 7. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Kawashima A, Oda Y, Yachie A, Koizumi S, Nakanishi I. 2002. Heme oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case. *Hum Pathol*, 33 (1):125-130.
- Kikkawa T, Sato N, Kojika M, Takahashi G, Aoki K, Hoshikawa K, Akitomi S, Shozushima T, Suzuki K, Wakabayashi G, Endo S. 2010. Significance of measuring S100A12 and sRAGE in the serum of sepsis patients with postoperative acute lung injury. *Dig Surg*, 27 (4):307-312.
- Kobashi H, Toshimori J, Yamamoto K. 2013. Sepsis-associated liver injury: Incidence, classification and the clinical significance. *Hepatol Res*, 43 (3):255-266.
- Kutty RK, Kutty G, Rodriguez IR, Chader GJ, Wiggert B. 1994. Chromosomal localization of the human heme oxygenase genes: heme oxygenase-1 (HMOX1) maps to chromosome 22q12 and heme oxygenase-2 (HMOX2) maps to chromosome 16p13.3. *Genomics*, 20 (3):513-516.
- Landry DW, Oliver JA. 2001. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med*, 345 (8):588-595.
- Maines MD. 2004. The heme oxygenase system: past, present, and future. *Antioxid Redox Signal*, 6 (5):797-801.
- Maines MD, Trakshel GM, Kutty RK. 1986. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem*, 261 (1):411-419.
- Mallinckrodt CH, Clark SW, Carroll RJ, Molenbergh G. 2003. Assessing response profiles from incomplete longitudinal clinical trial data under regulatory considerations. *J Biopharm Stat*, 13 (2):179-190.
- Mayr FB, Yende S, Angus DC. 2014. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*, 5 (1):4-11.
- McCoubrey WK, Jr., Eke B, Maines MD. 1995. Multiple transcripts encoding heme oxygenase-2 in rat testis: developmental and cell-specific regulation of transcripts and protein. *Biol Reprod*, 53 (6):1330-1338.
- Minne L, Abu-Hanna A, de Jonge E. 2008. Evaluation of SOFA-based models for predicting mortality in the ICU: A systematic review. *Crit Care*, 12 (6):R161.
- Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. 2000. Cytokine signaling--regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit Care Med*, 28 (4 Suppl):N3-12.
- Ono K, Mannami T, Iwai N. 2003. Association of a promoter variant of the haeme oxygenase-1 gene with hypertension in women. *J Hypertens*, 21 (8):1497-1503.

## 7. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Ono K, Goto Y, Takagi S, Baba S, Tago N, Nonogi H, Iwai N. 2004. A promoter variant of the heme oxygenase-1 gene may reduce the incidence of ischemic heart disease in Japanese. *Atherosclerosis*, 173 (2):315-319.
- Opal SM, Laterre PF, Francois B, LaRosa SP, Angus DC, Mira JP, Wittebole X, Dugernier T, Perrotin D, Tidswell M, Jauregui L, Krell K, Pacht J, Takahashi T, Peckelsen C, Cordasco E, Chang CS, Oeyen S, Aikawa N, Maruyama T, Schein R, Kalil AC, Van Nuffelen M, Lynn M, Rossignol DP, Gogate J, Roberts MB, Wheeler JL, Vincent JL. 2013. Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *JAMA*, 309 (11):1154-1162.
- Otterbein LE, Choi AM. 2000. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279 (6):L1029-1037.
- Payen D, Lukaszewicz AC, Belikova I, Faivre V, Gelin C, Russwurm S, Launay JM, Sevenet N. 2008. Gene profiling in human blood leucocytes during recovery from septic shock. *Intensive Care Med*, 34 (8):1371-1376.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29 (9):e45.
- Ponka P. 1999. Cell biology of heme. *Am J Med Sci*, 318 (4):241-256.
- Poss KD, Tonegawa S. 1997. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (20):10925-10930.
- Qaisiya M, Coda Zabetta CD, Bellarosa C, Tiribelli C. 2014. Bilirubin mediated oxidative stress involves antioxidant response activation via Nrf2 pathway. *Cell Signal*, 26 (3):512-520.
- Radhakrishnan N, Yadav SP, Sachdeva A, Pruthi PK, Sawhney S, Piplani T, Wada T, Yachie A. 2011. Human heme oxygenase-1 deficiency presenting with hemolysis, nephritis, and asplenia. *J Pediatr Hematol Oncol*, 33 (1):74-78.
- Rogy MA, Coyle SM, Oldenburg HS, Rock CS, Barie PS, Van Zee KJ, Smith CG, Moldawer LL, Lowry SF. 1994. Persistently elevated soluble tumor necrosis factor receptor and interleukin-1 receptor antagonist levels in critically ill patients. *J Am Coll Surg*, 178 (2):132-138.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74 (12):5463-5467.
- Saukkonen K, Lakkisto P, Kaunisto MA, Varpula M, Voipio-Pulkki LM, Varpula T, Pettila V, Pulkki K.

## 7. Literatur- und Quellenverzeichnis

2010. Heme oxygenase 1 polymorphisms and plasma concentrations in critically ill patients. *Shock*, 34 (6):558-564.
- Schillinger M, Exner M, Mlekusch W, Ahmadi R, Rumpold H, Mannhalter C, Wagner O, Minar E. 2002. Heme oxygenase-1 genotype is a vascular anti-inflammatory factor following balloon angioplasty. *J Endovasc Ther*, 9 (4):385-394.
- Schober P, Koch A, Zacharowski K, Loer SA. 2006. [Carbon monoxide: toxic molecule with antiinflammatory and cytoprotective properties]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 41 (3):140-149.
- Scott JR, Chin BY, Bilban MH, Otterbein LE. 2007. Restoring HOmeostasis: is heme oxygenase-1 ready for the clinic? *Trends Pharmacol Sci*, 28 (5):200-205.
- Semenza GL. 2000. Surviving ischemia: adaptive responses mediated by hypoxia-inducible factor 1. *J Clin Invest*, 106 (7):809-812.
- Sheu CC, Zhai R, Wang Z, Gong MN, Tejera P, Chen F, Su L, Thompson BT, Christiani DC. 2009. Heme oxygenase-1 microsatellite polymorphism and haplotypes are associated with the development of acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med*, 35 (8):1343-1351.
- Shibahara S, Kitamuro T, Takahashi K. 2002. Heme degradation and human disease: diversity is the soul of life. *Antioxid Redox Signal*, 4 (4):593-602.
- Singer M, De Santis V, Vitale D, Jeffcoate W. 2004. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet*, 364 (9433):545-548.
- Soares MP, Bach FH. 2009. Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential. *Trends Mol Med*, 15 (2):50-58.
- Sponholz C, Huse K, Kramer M, Giamarellos-Bourboulis EJ, Claus RA, Kern A, Engel C, Kuhnt E, Kiehntopf M, Routsis C, Mylona V, Tsangaris I, Heinemann SH, Reinhart K, Platzer M, Bauer M. 2012. Gene polymorphisms in the heme degradation pathway and outcome of severe human sepsis. *Shock*, 38 (5):459-465.
- Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. 1987. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*, 235 (4792):1043-1046.
- Sun Y, Lu Y, Engeland CG, Gordon SC, Sroussi HY. 2013. The anti-oxidative, anti-inflammatory, and

## 7. Literatur- und Quellenverzeichnis

- protective effect of S100A8 in endotoxemic mice. *Mol Immunol*, 53 (4):443-449.
- Takaki S, Takeyama N, Kajita Y, Yabuki T, Noguchi H, Miki Y, Inoue Y, Nakagawa T, Noguchi H. 2010. Beneficial effects of the heme oxygenase-1/carbon monoxide system in patients with severe sepsis/septic shock. *Intensive Care Med*, 36 (1):42-48.
- Ten Cate H, Schoenmakers SH, Franco R, Timmerman JJ, Groot AP, Spek CA, Reitsma PH. 2001. Microvascular coagulopathy and disseminated intravascular coagulation. *Crit Care Med*, 29 (7 Suppl):S95-97; discussion S97-98.
- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. 1968. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 61 (2):748-755.
- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. 1969. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem*, 244 (23):6388-6394.
- Tenhunen R, Ross ME, Marver HS, Schmid R. 1970. Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate dependent biliverdin reductase: partial purification and characterization. *Biochemistry*, 9 (2):298-303.
- Van Zoelen MA, Achouiti A, van der Poll T. 2011. The role of receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in infection. *Crit Care*, 15 (2):208.
- Vile GF, Basu-Modak S, Waltner C, Tyrrell RM. 1994. Heme oxygenase 1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (7):2607-2610.
- Vincent JL, de Mendonca A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, Sprung CL, Colardyn F, Blecher S. 1998. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med*, 26 (11):1793-1800.
- Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. 1997. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*, 390 (6658):350-351.
- Ward RJ, Crichton RR, Taylor DL, Della Corte L, Srai SK, Dexter DT. 2011. Iron and the immune system. *J Neural Transm*, 118 (3):315-328.
- Wegiel B, Hanto DW, Otterbein LE. 2013. The social network of carbon monoxide in medicine. *Trends Mol Med*, 19 (1):3-11.

## 7. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Wiesel P, Patel AP, DiFonzo N, Marria PB, Sim CU, Pellacani A, Maemura K, LeBlanc BW, Marino K, Doerschuk CM, Yet SF, Lee ME, Perrella MA. 2000. Endotoxin-induced mortality is related to increased oxidative stress and end-organ dysfunction, not refractory hypotension, in heme oxygenase-1-deficient mice. *Circulation*, 102 (24):3015-3022.
- Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, Ohta K, Kasahara Y, Koizumi S. 1999. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest*, 103 (1):129-135.
- Zegdi R, Perrin D, Burdin M, Boiteau R, Tenaillon A. 2002. Increased endogenous carbon monoxide production in severe sepsis. *Intensive Care Med*, 28 (6):793-796.
- Ziegler EJ, Fisher CJ, Jr., Sprung CL, Straube RC, Sadoff JC, Foulke GE, Wortel CH, Fink MP, Dellinger RP, Teng NN, et al. 1991. Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The HA-1A Sepsis Study Group. *N Engl J Med*, 324 (7):429-436.